

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**  
***Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia***



**WILSON CECILIANO DA SILVA**

**Sensor amperométrico a base de nanotubos de carbono e ácido Ferúlico para  
a detecção eletrocatalítica de NADH**

Maceió  
2011

**WILSON CECILIANO DA SILVA.**

**Sensor amperométrico a base de nanotubos de carbono e ácido ferúlico para  
detecção eletrocatalítica de NADH**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química e Biotecnologia da  
Universidade Federal de Alagoas, como  
requisito para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Marília Oliveira  
Fonseca Goulart

Maceió

2011

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecário: Cláudio César Temóteo Galvino – CRB4/1459

S586s Silva, Wilson Ceciliano da.  
Sensor amperométrico a base de nanotubos de carbono e ácido ferúlico para detecção eletrocatalítica de NADH / Wilson Ceciliano da Silva. – 2011.  
103 f.: il.

Orientadora: Marília de Oliveira Fonseca Goulart.  
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 87-103.

1. Eletroquímica. 2. Química orgânica. 3. Físico-química. 4. Ácido ferúlico. 5. Nanotubos de carbono. 6. Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). I. Título.

CDU: 543.553



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384  
Email: cogob@qui.ufal.br

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO WILSON CECILIANO DA SILVA.

Aos nove (09) dias do mês de fevereiro de 2011, às 9h, reuniu-se na Sala de Reuniões do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do mestrando **Wilson Ceciliano da Silva**, composta pelos Professores Doutores: Marília Oliveira Fonseca Goulart – Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL), José Rui Machado Reys (ESENFAR/UFAL) e Paulo da Silva Roldan (PPGQB/IQB/UFAL). Após a apresentação oral por 50 minutos do trabalho intitulado “Um Novo Sensor Amperométrico para NADH, à Base de Ácido Ferúlico e Nanotubos de Carbono”, o mestrando foi em seguida arguido pela Banca Examinadora durante 1 horas e 30 minutos. Reunidos em sessão secreta, os membros da comissão deliberaram por sua APROVAÇÃO fazendo jus ao título de **Mestre em Ciências**, na Área de Concentração Química Orgânica pelo Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Sem mais para relatar, eu, Marília Oliveira Fonseca Goulart assino a presente Ata, em comum acordo com os demais membros da Comissão Examinadora.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Oliveira Fonseca Goulart Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Prof. Dr. José Rui Machado Reys Jose Rui Machado Reys  
Prof. Dr. Paulo da Silva Roldan Paulo da Silva Roldan

ADENDO:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*A Deus, pelo dom da vida.*

**“...Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça. No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade...”.**

*A minha família.*

*Minha mãe (Luciene), meu pai (Jose Ceciliano) e meus irmãos, primos ; pela presença e apoio incondicional e em especial agradeço a meu tio José Roberto e sua esposa que me acolheu em todos os momentos*

## AGRADECIMENTOS

*A prof<sup>a</sup>. Marília Goulart, pela oportunidade, orientação, apoio e confiança;*

*Ao prof<sup>o</sup>. Phabyanno Lima, pela co-orientação, amizade e tantos ensinamentos;*

*Ao prof<sup>o</sup>. Lauro Tatsuokubota, pelo acolhimento e suporte durante as viagens à UNICAMP;*

*Aos amigos do Laboratório de Eletroquímica – Lequi; pelo excelente convívio e companheirismo no dia-a-dia;*

*Aos amigos Francisco, Cleylton, Roberta, Carmen, Aurenívia, Eleny, Adeilto, e Edmar, pelo apoio e conselhos .*

*Aos técnicos e funcionários do Instituto de Química e Biotecnologia, pela contribuição logística;*

*A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, pelo empenho e esforço em melhorar o nosso programa;*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – pela concessão de bolsa de estudos, a qual possibilitou a execução desta dissertação;*

*E em especial ao meu tio José Roberto sua esposa Silvânia e filhos Robinho e Roberval, pelo apoio nos primeiros anos de faculdade a minha irmã Katia;*

*Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.*

**Muito obrigado!**

## **PROCAD/CAPES**

***Ao PROCAD/CAPES, um importante programa de cooperação acadêmica entre as universidades UFAL e UNICAMP incentivadas pelo governo federal, sob orientação dos professores Lauro Tatsuo Kubota e Marília Oliveira Fonseca Goulart. Particularmente, durante o mestrado, foi possível realizar várias missões com resultados muito interessantes, além da troca de experiências entre as universidades envolvidas. Contamos com o apoio de forma especial dos novos amigos do LEEDS: Wilney Santos, Murilo Santhiago. Estes proporcionaram um ambiente salutar, divertido e proveitoso, facilitando, portanto, todo o andamento do trabalho.***

***Obrigado a todos !!!***

**"Não confunda derrota com fracasso nem vitória com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias."**

**Roberto Shinyashiki**



## RESUMO

Neste trabalho, é descrito o desenvolvimento de uma plataforma nanoestruturada simples e eficiente à base de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, MWCNT) funcionalizados com ácido ferúlico (AF) no intuito de desenvolver um sensor analítico a base de NADH. A *poli*-AF, foi eletrogerada *in situ* sobre o MWCNT depositado em carbono vítreo, gerando, o par redox quinona/hidroquinona,  $E^\circ = 0,244$  vs. Ag/AgCl. As técnicas empregadas para a realização deste trabalho foram voltametria cíclica e cronoamperometria, as quais foram utilizadas para estudar o comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados, obtenção dos parâmetros cinéticos e caracterização analítica da plataforma. Os estudos cronoamperométricos foram também realizados com o objetivo de se obter maiores informações sobre os processos de oxidação entre a NADH e a plataforma funcionalizada. Assim, por meio de gráficos e equações de Cottrell foi possível obter os valores aparentes para o coeficiente de difusão ( $D_{\text{NADH}}$ ) e constante catalítica da reação ( $\kappa_{\text{cat}}$ ) para a NADH. Os valores do  $D_{\text{NADH}}$  e de  $\kappa_{\text{cat}}$ , determinados para a NADH, foram de  $4,49 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $5,57 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ , respectivamente. O aumento na velocidade de reação para o NADH foi atribuído à eficiente transferência de elétrons entre esta espécie responsável pelo par redox (quinona/hidroquinona), eletrogerado *in situ*. O sensor amperométrico apresentou em relação ao NADH uma faixa linear de resposta abrangendo a faixa de  $1,0 - 20,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , limite de detecção ( $0,0927 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), limite de quantificação ( $0,309 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sensibilidade ( $0,29 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ ), potencial de detecção ( $+0,200 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ), tempo de resposta de detecção de  $0,2 \text{ s}$ . A partir do desempenho obtido, a plataforma nanoestruturada fundamentada em MWCNT e AF, justifica a utilização deste sistema como um novo candidato a mediador redox, tornando-se um ambiente excelente para a configuração de novos biossensores que empregam enzimas NADH dependentes.

Palavras-chave: Eletroquímica. Físico-química. Ácido Ferúlico. Nanotubos de Carbono. NicotinamidaAdeninaDinucleotídeo.

## ABSTRACT

In this paper, we describe the development of a simple and efficient nanostructured platform based in multi-walled carbon nanotube (MWCNT) functionalized with ferulic acid (FA) in order to develop an analytical sensor for NADH. The poly-AF was electrogenerated in situ on the MWCNT deposited on glassy carbon, generating the coupled redox quinone / hydroquinone,  $E^\circ = 0.244$  vs. Ag / AgCl. The techniques used for this study were cyclic voltammetry and chronoamperometry, which were used to study the electrochemical behavior of modified electrode, kinetic parameters and analytical characterization of the platform. The chronoamperometric studies were also performed in order to obtain more information about the processes of oxidation of NADH and functionalized platform. Thus, using graphs and equations of Cottrell was possible to obtain values for the apparent diffusion coefficient (NADH) and constant catalytic reaction  $\kappa_{\text{cat}}$  to NADH. The values of  $D_{\text{NADH}}$  and  $\kappa_{\text{cat}}$  determined were  $4.49 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $5.57 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ L}$ , respectively. The increase in reaction rate for NADH was attributed to efficient electron transfer between the species responsible for the redox couple (quinone / hydroquinone), electrogenerated in situ. The amperometric sensor in relation to NADH showed a linear range covering the range 1.0 to 20.3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , limit of detection ( $0.0927 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), limit of quantification ( $0.309 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sensitivity ( $0,29 \mu\text{A L} \mu\text{mol}^{-1}$ ), detection potential (+0.200 V vs. Ag / AgCl), response time of detection of 0.2s. From the performance achieved, the platform on nanostructured MWCNT fundamentada AF and justifies the use of this system as a new candidate for a redox mediator, becoming it an excellent ambient for the configuration of new biosensors that employ enzymes NADH dependent.

Keywords: Electrochemistry. Physical Chemistry. ferulic acid. Carbon Nanotubes. Nicotinamide Adenine Dinucleotide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	(3-mercapitopropil) metildimetoxisilano	22
Figura 2	Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico	27
Figura 3	Número de publicações de artigos científicos em revistas com política editorial seletiva, usando como palavra-chave “sensor” ou “sensors” entre os anos de 2005 a novembro de 2010.	28
Figura 4.	Estruturas químicas do NADH e NAD(P)H. b)Reação redox do NADH.	30
Figura 5	Representação esquemática: (a) MWCNT e (b) SWCNT.	32
Figura 6	Ácido Ferúlico	34
Figura 7	Subunidadee estruturais do ácido ferúlico	35
Figura 8	Esquema a) mostrando o mecanismo de formação da quinona derivada do ácido ferúlico, b) estabilização da espécie catiônica.	36
Figura 9	Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q•) e hidroquinonas (QH <sub>2</sub> ), respectivamente.	37
Figura 10	Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios. Adaptado da referência	38
Figura 11	Fotografia de um Potenciostato modelo PGSTAT30EcoChemie da AUTOLAB.	40
Figura 12	Fotografia do EDR da AUTOLAB.	41

Figura 13	Modelo esquemático da célula eletroquímica utilizada em todos os experimentos.	41
Figura 14	<i>Orto</i> -quinona	45
Figura 15	Voltamograma das 10 ciclagens na faixa de -0,25 a 0,8 V para a polimerização e ativação do GCE/MWCNT com ácido ferúlico 0,4 mmol L <sup>-1</sup> em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 4,5 e $v = 0,020 \text{ V s}^{-1}$ .	46
Figura 16	<i>Voltamograma das 10 ciclagens na faixa de -0,25 a 0,575V para a polimerização e ativação do GCE/MWCNT com ácido ferúlico 0,8 mmol L<sup>-1</sup> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5 e <math>v = 0,020 \text{ V s}^{-1}</math>.</i>	47
Figura 17	<i>voltamograma das 10 ciclagens na faixa de 0,0 a 0,575 V para a polimerização e ativação do GCE/MWCNT com ácido ferúlico 0,4 mmol L<sup>-1</sup> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5 e <math>v = 0,020 \text{ V s}^{-1}</math>.</i>	48
Figura 18	Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-AF frente ao NADH, variando quantidade de nanotubos da plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT.	50
Figura 19	Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-AF frente ao NADH, variando concentração de ácido Ferúlico usado na preparação do sistema ECV/MWCNT/poli-AF.	51
Figura 20	Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-AF frente ao NADH, variando o numero de scans usado na preparação do sistema ECV/MWCNT/poli-AF.	52
Figura 21	Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-	53

AFrente ao NADH, variando a velocidade de ciclagem usada na preparação do sistema ECV/MWCNT/*poli*-AF.

Figura 22	Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/ <i>poli</i> -AF frente ao NADH, variando o pH usado na preparação do sistema ECV/MWCNT/ <i>poli</i> -AF.	54
Figura 23	Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/ <i>poli</i> -AF em solução de tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura (0,005 - 0,100 V s <sup>-1</sup> ), E <sub>inicial</sub> = -0,25 e E <sub>λ</sub> = 0,7 varredura no sentido anódico.	55
Figura 24	Dependência da corrente de pico anódico (I <sub>pa</sub> ) e catódico (I <sub>pc</sub> ) em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0.	56
Figura 25	Gráfico de E <sub>p</sub> vs. log $\nu$ a partir do voltamogramas ciclicos em varias velocidade de varreduras.	57
Figura 26	Efeito do pH no comportamento redox do ECV/MWCNT/ <i>poli</i> -AF, voltamogramas obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> e $\nu$ = 0,05 V s <sup>-1</sup> .	60
Figura 27	Potencial formal (E <sup>0</sup> ) do ECV/MWCNT/ <i>poli</i> -AF em função do pH. Condições empregadas: solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> e $\nu$ = 0,050 V s <sup>-1</sup> .	60
Figura 28	Voltamogramas cíclicos para o ECV-MWCNT- <i>poli</i> -AF e MWCNT (D) na ausência e na presença de NADH. Velocidade de varredura ( $\nu$ ): 0,005 V s <sup>-1</sup> . Estudos realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , em pH 7,0.	62
Figura 29	Variação da corrente de pico anódica I <sub>pa</sub> vs. $\nu^{1/2}$ no ECV/MWCNT/ <i>poli</i> -AF em solução contendo 0,4 mmol L <sup>-1</sup>	63

<sup>1</sup>de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e  $\nu$ : 0,005-0,011 V s<sup>-1</sup>.

Figura 30	Varição da corrente de pico anódica normalizada $I_{pa}/\nu^{1/2}$ vs. $\nu$ no ECV/MWCNT/poli-AF em solução contendo 0,4 mmol L <sup>-1</sup> de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 e $\nu$ : 0,005-0,017 V s <sup>-1</sup> .	64
Figura 31	Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de oxidação eletrocatalítica do NADH sobre a plataforma ECV/MWCNT/poli-AF.	65
Figura 32	Eficiência catalítica em função do pH de catalise e/ou potencial aplicado.	66
Figura 33	variação eficiencia catalítica em função do meio tamponante	67
Figura 34-	Cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/poli-AF em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 7 na ausência e presença de NADH, $E_{inicial} = +0,200$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.	69
Figura 35-	Integração dos cronoamperogramas obtidos ECV/MWCNT/poli-AF em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 7, $E_{inicial} = +0,200$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.	70
Figura 36	Gráfico de $I$ vs. $t^{-1/2}$ obtidos a partir dos cronoamperogramas da Figura 42 em ECV/MWCNT/poli-AF em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 7 na ausência e presença de NADH, $E_{inicial} = +0,200$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.	71

Figura 37	Gráfico de inclinação ( $I/t^{1/2}$ ) versus a concentração de NADH obtidos a partir da Figura 44 do ECV/MWCNT/poli-AF em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7 na ausência e presença de NADH, $E_{\text{inicial}} = +0,200 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, respectivamente.	72
Figura 38	Dependência de $I_{\text{cat}}/I_{\text{lim}}$ vs. $t^{1/2}$ derivado dos cronoamperogramas da Figura IV.18 em ECV/MWCNT/poli-AF em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7 na ausência e presença de NADH, $E_{\text{inicial}} = +0,200 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, respectivamente.	73
Figura 39	Gráfico da inclinação de $I_{\text{cat}}/I_{\text{Lim}}$ vs. concentração de NADH em ECV/MWCNT/poli-AF em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7 na ausência e presença de NADH, $E_{\text{inicial}} = +0,200 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, respectivamente.	73
Figura 40	Curvas de polarização obtidas para oxidação eletrocatalítica de NADH, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ : no GCE/MWCNT/poli-AF. $v = 5,0 \text{ mVs}^{-1}$ .	75
Figura 41	Gráfico de Levich para a resposta eletrocatalítica de estado-estacionário para um EDR de ECV/MWCNT/poli-XA em diferentes [NADH]. Estudos realizados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 e $\Gamma = 3.35 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .	77
Figura 42	Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados na Figura 32. Estudos realizados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 e $\Gamma = 3.35 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .	79
Figura 43	(a) Variação de $k_{\text{cat}}$ vs. [NADH] obtidos para o ECV/MWCNT/poli-AF e (b) Variação de $1/k_{\text{cat}}$ vs. [NADH]. Estudos realizados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 e $\Gamma = 3.35 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .	81

Figura 44	Corrente em função do potencial aplicado para o ECV/MWCNT/poli-AF em presença de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH. Condições utilizadas, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.	83
Figura 45	Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/poli-AF obtidas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.	84
Figura 46	Curva analítica para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/poli-AF em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 $E_{\text{aplicado}} = +0,200 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. Inserção: Faixa linear de resposta do sensor.	84



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros eletroquímicos de eletrodos modificados.	58
Tabela 2	Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados para eletro-oxidação de NADH.	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DPR</b>	<b>Desvio padrão relativo</b>
<b>ECV</b>	<b>Eletrodo de carbono vítreo</b>
<b>EDR</b>	<b>Eletrodo de disco rotatório</b>
<b>EPC</b>	<b>Eletrodo de pasta de carbono</b>
<b>EQM</b>	<b>Eletrodo quimicamente modificado</b>
<b>LD</b>	<b>Limite de detecção</b>
<b>LQ</b>	<b>Limite de quantificação</b>
<b>MED</b>	<b>Mediador</b>
<b>MWCNT</b>	<b>Nanotubos de carbono de paredes múltiplas</b>
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)</b>
<b>NAD(P)H</b>	<b>Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida</b>
<b>NTC</b>	<b>Nanotubos de carbono</b>
<b>SWCNT</b>	<b>Nanotubos de carbono de paredes simples</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Coeficiente de transferência de elétrons
$\Delta E_p$	Separação de potencial de pico
$A$	Área geométrica do eletrodo
Ag/AgCl	Eletrodo de prata cloreto de prata
$B$	Coeficiente angular
$C_o$	Concentração do analito
$D$	Coeficiente de difusão
$E$	Potencial
$N$	Número de elétrons
$E^{o'}$	Potencial formal
$E_{\lambda}$	Potencial de inversão
$E_{inicial}$	Potencial inicial
$E_{final}$	Potencial final
$E_p$	Potencial de pico
$E_{pa}$	Potencial de pico anódico
$E_{pc}$	Potencial de pico catódico
$F$	Constante de <i>Faraday</i>
$I$	Corrente
$k_{cat}$	Constante de velocidade da reação
$N$	Número total de elétrons
$NAD^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
AF	Ácido Ferúlico
$Q$	Carga
$R$	Constante universal dos gases
$R$	Coeficiente de correlação
$\sigma$	Desvio padrão
$T$	Temperatura
$\nu$	Velocidade de varredura de potencial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Eletroquímica</b>	<b>20</b>
<b>1.2</b>	<b>Eletrodos quimicamente modificados</b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Modificação de eletrodos</b>	<b>21</b>
1.3.1	Adsorção	23
1.3.2	Ligação covalente	23
1.3.3	Filmes poliméricos	24
1.3.4	Materiais compósitos	24
1.3.5	Eletrodos de pasta de carbono	25
<b>1.4</b>	<b>Sensores eletroquímicos</b>	<b>25</b>
<b>1.5</b>	<b>Importância da detecção do NADH</b>	<b>29</b>
<b>1.6</b>	<b>Nanotubos de carbono: importância e diversidade</b>	<b>31</b>
<b>1.7</b>	<b>Ácido Ferúlico</b>	<b>34</b>
1.7.1	Eletroquímica de quinonas	37
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>40</b>

<b>3.1</b>	<b>Reagentes</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Equipamentos e materiais</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Preparação de solução de AF</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Preparação da dispersão de MWCNT</b>	<b>42</b>
<b>4.3</b>	<b>Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)</b>	<b>42</b>
<b>4.4</b>	<b>Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e AF</b>	<b>43</b>
<b>4.5</b>	<b>Estudo de Eletrocatalise do ECV/MWCNT/AF e NADH</b>	<b>43</b>
4.5.1	Determinação da área ativa	43
4.5.2	Estudo da estabilidade e tempo de vida do sensor	44
4.5.3	Estudo de repetibilidade do preparo do sensor	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Preparação do eletrodo modificado</b>	<b>45</b>
<b>5.2</b>	<b>Otimização dos parâmetros de ativação</b>	<b>49</b>
<b>5.3</b>	<b>Características Cinéticas do ECV/MWCNT/poli-AF</b>	<b>54</b>

<b>5.4</b>	<b>Estudos Cronoamperométricos</b>	<b>68</b>
<b>5.5</b>	<b>Estudos com Eletrodos de Disco Rotatório</b>	<b>70</b>
<b>5.6</b>	<b>Detecção amperométrica de NADH</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>86</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>87</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Eletroquímica

A eletroquímica, em termos simples, é a ciência das reações de transferência de carga elétrica, que ocorrem sob a influência de um gradiente de potencial eletroquímico. Frequentemente, esta separação de carga leva à transferência de elétrons, a qual pode ocorrer homoganeamente em solução, ou heterogeneamente na superfície de eletrodos. Sendo assim, os métodos eletroquímicos fazem uso da medida de uma propriedade elétrica, isto é possível, uma vez que muitas espécies químicas possuem a capacidade de sofrer reações de oxidação-redução, quando em contato com a superfície do eletrodo (BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 2000).

## 1.2 Eletrodos quimicamente modificados

A expressão “Eletrodos quimicamente modificados (EQM)” foi utilizada por Murray e colaboradores, na década de 70 e, a seguir, por Hubbard, Miller e seus colaboradores (LANE e HUBBARD, 1973 e WATKINS *et al.*, 1975). Os primeiros trabalhos descreveram a preparação de eletrodos com superfícies modificadas. Até então só eram utilizados eletrodos a partir de materiais ditos “inertes”, tais como carbono, ouro, platina e mercúrio.

A área de pesquisa em EQM divergiu nitidamente do tradicional campo de adsorção na superfície de eletrodos (MURRAY *et al.*, 1984). A adsorção de substâncias químicas passou a ser intencional, com “imobilização” de uma série de substâncias. Como consequência do processo, novas propriedades (química, eletroquímica, óptica e outras) foram obtidas.

O objetivo principal desta modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução para alterar a reatividade e a seletividade do sensor base, aumentando assim, o espectro de possibilidades para a

obtenção não somente de uma variação funcional, mas também de uma variação química dos eletrodos modificados (RUSLING *et al.*, 1984).

### 1.3 Modificação de eletrodos

A performance dos eletrodos já foi limitada pela solução e o material com o qual o eletrodo era feito, bem como pelo potencial aplicado à superfície do mesmo. Tais inconvenientes vêm sendo contornados a partir da modificação da superfície eletródica, bem como pela atual disponibilidade de materiais e novos materiais, garantindo, portanto, sua viabilidade operacional.

Neste sentido, a modificação química da superfície pode fornecer maior seletividade, ou seja, pode minimizar ou eliminar processos reacionais paralelos e indesejáveis, diminuir o bloqueio de superfície por passivação e melhorar a cinética dos processos eletrocatalíticos.

O primeiro exemplo de uma modificação deliberada da superfície eletródica foi o trabalho de Lane e Hubbard (LANE e HUBBARD, 1973). Estes pesquisadores promoveram a adsorção de várias olefinas funcionalizadas na superfície de eletrodos de platina, haja vista a propensão de grupos alcenos de se quimissorverem sobre este metal. Neste trabalho pioneiro foram feitas observações importantes. Por exemplo, foi observada a capacidade do ácido 3-alil-salicílico de se coordenar seletivamente com o ferro, em função do potencial aplicado. Este fato foi a primeira indicação da utilidade analítica de eletrodos quimicamente modificados, pois demonstrou a capacidade de um grupo imobilizado complexar um íon metálico, bem como a possibilidade de direcionamento da coordenação por meio da escolha do potencial aplicado.

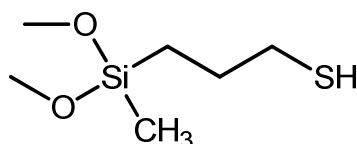
Já, a incorporação de nanoestruturas na superfície dos eletrodos iniciou-se em 1990, quando se iniciou o uso de nanopartículas de ouro. Essas estruturas foram inicialmente usadas para aumentar o sinal eletroquímico devido a sua alta razão superfície/volume e, gradualmente o trabalho progrediu, com incorporação de sistemas biológicos. Este aumento da área ativa permitiu a obtenção de baixos



limites de detecção e a análise em sistemas biológicos, devido à alta seletividade (ALKIRE *et al.*, 2009).

O aumento da área pode ainda ser acompanhado por um controle no tamanho e na distribuição das estruturas produzidas na superfície do eletrodo. Natan e colaboradores (1995) foram os pioneiros neste campo de pesquisa. Sua ideia inicial era ligar nanopartículas à superfície de um eletrodo de platina para aumentar o desempenho do eletrodo. Em um primeiro estudo, a superfície de uma folha de platina foi coberta com um polímero de (3-mercaptopropil)metildimetoxisilano (Figura 1). Este eletrodo modificado foi imerso em uma solução de nanopartículas de ouro de 15 nm, para só então ser ativado à sua espécie redox ativa. Os autores também observaram que o eletrodo é bloqueado se ativado e apenas modificado com a espécie orgânica – a ausência das nanopartículas de ouro inviabiliza o processo, o que mostra que a nanopartícula de ouro tem papel fundamental no processo (NATAN *et al.*, 1995).

**Figura 1. Estrutura química do (3-mercaptopropil) metildimetoxisilano.**



Fonte: Autor, 2011.

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto de fundamental importância na preparação de um eletrodo quimicamente modificado (EQM). Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais, podemos citar ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono. Já, o carbono vítreo reticulado, materiais plásticos condutores e vidros condutores estão incluídos entre os substratos menos usuais (NOSSOL, 1983).

Na história do EQM, o uso de camadas de agentes modificadores sobre a superfície do eletrodo base tem sido a forma mais comum de modificar a superfície de um eletrodo. Assim, podem-se destacar diversos métodos de modificação da superfície eletródica a partir do trabalho clássico de revisão reportado na literatura de Kubota e colaboradores (2002), como discutido a seguir.

### 1.3.1 Adsorção

A adsorção consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução. Inicialmente, os trabalhos envolveram adsorção em eletrodos de platina. Porém, na maioria dos trabalhos subseqüentes, as adsorções foram realizadas em eletrodos de grafite e carbono vítreo (BARTLETT, 1990). A técnica de adsorção é muito empregada, dada suas simplicidade e eficiência. No entanto, a mesma apresenta a desvantagem de produzir EQMs com no máximo uma monocamada do modificador imobilizado, o que geralmente limita a faixa de resposta linear. Por outro lado, a adsorção é um processo de equilíbrio, o que pode levar à ocorrência de dessorção do modificador para o meio durante sua utilização, resultando na perda de reprodutibilidade e redução da vida útil do EQM assim preparado.

### 1.3.2 Ligação covalente

O modificador é fixado covalentemente ao eletrodo com a manipulação da reatividade dos grupos funcionais do modificador e do substrato. Neste caso, deve-se supor o envolvimento de um substrato com ação não apenas de um condutor eletrônico, mas preparado de tal forma que ocorram ligações covalentes com moléculas quimicamente ativas. Substratos como o carbono e os óxidos metálicos são convenientes para estabelecer ligações tipo ésteres, éteres, amidas, entre outros grupos funcionais. O método de modificação via ligação covalente leva a uma maior estabilidade, em relação aos demais métodos, contudo requer maior tempo para o procedimento, gera cobertura com no máximo, uma monocamada imobilizada, além de ser mais difícil de se executar. Seu emprego é de especial


interesse para a imobilização de enzimas, sendo amplamente empregado nesta área (DIVYA *et al.*, 1998).

### 1.3.3 Filmes poliméricos

Esta técnica consiste no recobrimento da superfície do eletrodo, com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. Ao contrário das técnicas discutidas anteriormente, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica.

Desta forma, filmes poliméricos têm sido empregados no desenvolvimento de sensores para evitar alguns problemas do sinal analítico a partir de reações paralelas, bem como para imobilizar biocomponentes, incorporar mediadores e fornecer biocompatibilidade (SOUZA e FAGAN, 1997). Devido à grande variedade das características dos polímeros, pode-se explorar suas propriedades conforme o interesse. Dessa forma, polímeros eletroativos (eletrocatalise), quimicamente ativos (propriedades ligantes ou de troca-iônica para pré-concentração) e inertes (apenas exclusão de interferentes) são frequentemente utilizados (WALLACE e KANE-MAGUIRE, 2002; ROZLOSNIK, 2009).

### 1.3.4 Materiais compósitos

Compósitos representam uma classe de materiais onde duas ou mais substâncias combinadas passam a exibir propriedades únicas, que não são possíveis de serem obtidas a partir de seus componentes individuais. Eles podem ser formados pela combinação de diferentes materiais, do tipo inorgânico-inorgânico, orgânico-orgânico ou orgânico-inorgânico, sendo neste último caso, também chamados de materiais híbridos (GEHR, e BOYD, 1996; e CHUJO 1996). Esta técnica é adequada para modificar eletrodos à base de carbono em  tais como em eletrodos de pasta de carbono e pastilhas. Esta grande variedade de materiais e possibilidades de combiná-los proporciona um campo de atuação de forte perspectiva dos EQMs (MOUSTY, 2004; ANTOLINI, 2010).

### 1.3.5 Eletrodos de pasta de carbono

Os eletrodos de pasta de carbono são exemplos de modificação utilizando compósitos. As pastas de carbono consistem em uma mistura homogênea de grafite em pó e um líquido orgânico hidrofóbico (óleo mineral, óleo de parafina, óleo de silicone, etc) colocados em um tubo de vidro ou plástico. A sua superfície é facilmente renovada, uma vez que a camada mais externa pode ser removida, por lixamento ou corte. O aglutinante, cuja função é dar consistência à mistura e também preencher os interstícios entre as partículas de grafite, deve ser eletroinativo, quimicamente inerte, imiscível com a água, apresentar baixa volatilidade e não conter impurezas. (ŠVANCARA e SCHACHL, 1999).

Os eletrodos de pasta de carbono (EPC) foram introduzidos por Adams e colaboradores, em 1958 (ADAMS, 1958), (OLSON e ADAMS, 1960; OLSON e ADAMS, 1963).

As principais vantagens do EPC são o baixo custo e facilidade de preparação, baixo ruído, corrente residual baixa, ampla janela de operação em solução aquosa e a possibilidade de renovação da superfície. Na literatura são relatados vários trabalhos utilizando EPC, por exemplo, na determinação de flavonóides, (ZOULIS e EFSTATHIOU, 1996) traços de metais (WANG *et al.*, 2001) e peróxido de hidrogênio (VARMA e MITRA, 2002).

Como base na versatilidade dos processos metodológicos de modificação da superfície eletródica, discutir-se-á pormenorizadamente como tais modificações são de fundamental importância para o desenvolvimento de sistemas analíticos, como por exemplo, os sensores eletroquímicos.

## 1.4 Sensores eletroquímicos

Sensores químicos são dispositivos que podem ser usados para medidas diretas na amostra. Idealmente, tais dispositivos são capazes de responder continuamente e reversivelmente sem perturbar a amostra. Estes dispositivos também podem

eliminar a necessidade de tratamento prévio da amostra nas diferentes matrizes, sejam de origem biológica, ambiental ou farmacológica.

Estes sensores consistem de um elemento de transdução, recoberto com uma camada de um elemento de reconhecimento para modificação da superfície, seja químico ou biológico. Esta camada interage com o analito e a mudança química resultante desta interação é traduzida pelo elemento de transdução em sinal elétrico.

No caso dos sensores eletroquímicos, o transdutor é o equipamento (potenciostato) munido por um conjunto de eletrodos. Sendo assim, o transdutor eletroquímico é um dispositivo que transforma informações químicas, como a concentração de um componente específico da amostra em relação a sua composição total, em um sinal analiticamente mensurável (WANG *et al.*, 2000; THÉVENOT *et al.*, 2001).

Sensores eletroquímicos são, portanto, dispositivos que apresentam uma interface (reconhedora) onde ocorrem fenômenos químicos, a qual está ligada ao transdutor físico-químico que transforma uma informação química, oriunda de um sistema (analito), em um sinal analítico útil (AHAMMAD, 2009; FARRÉ, *et al.*, 2009).

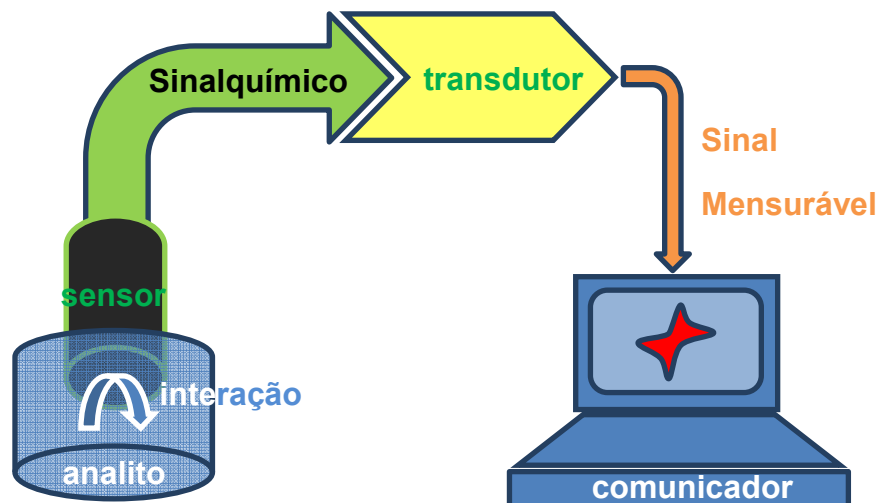
A informação obtida no instrumento de medida pode estar relacionada a uma reação química ou mesmo a uma propriedade química do analito. Além do transdutor, os sensores químicos apresentam outras partes básicas: o receptor ou a fase sensora - região reconhedora onde ocorre a reação química seletiva e o condutor, que transporta o sinal para a instrumentação de medida.

A fase sensora pode ser um corante ácido/básico, um trocador iônico, uma substância redox, uma substância fluorescente, um anticorpo, entre outros (THÉVENOT *et al.*, 2001), enquanto o transdutor pode ser classificado como: eletroquímico (corrente, condutividade, potencial), óptico (absorção, fluorescência, reflectância), calorimétrico (calor) ou piezelétrico (alteração de massa). O transdutor, sensível a essas variações, converterá a energia do evento numa forma mensurável.

A Figura 2 (pag. 8) mostra um modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico, onde ocorre interação entre o analito e a fase sensora. Esta interação poderá causar uma variação na concentração, por exemplo, de prótons, íons específicos, transferência de elétrons, liberação ou absorção de

gases, tais como:  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $NH_3$ , etc. Além disso, poderá através deste evento apresentar uma mudança de algum parâmetro óptico do sistema, como cor, índice de refração, por exemplo, que podem ser monitorados tanto qualitativa quanto quantitativamente.

Figura 2. Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.



Fonte: Autor, 2011.

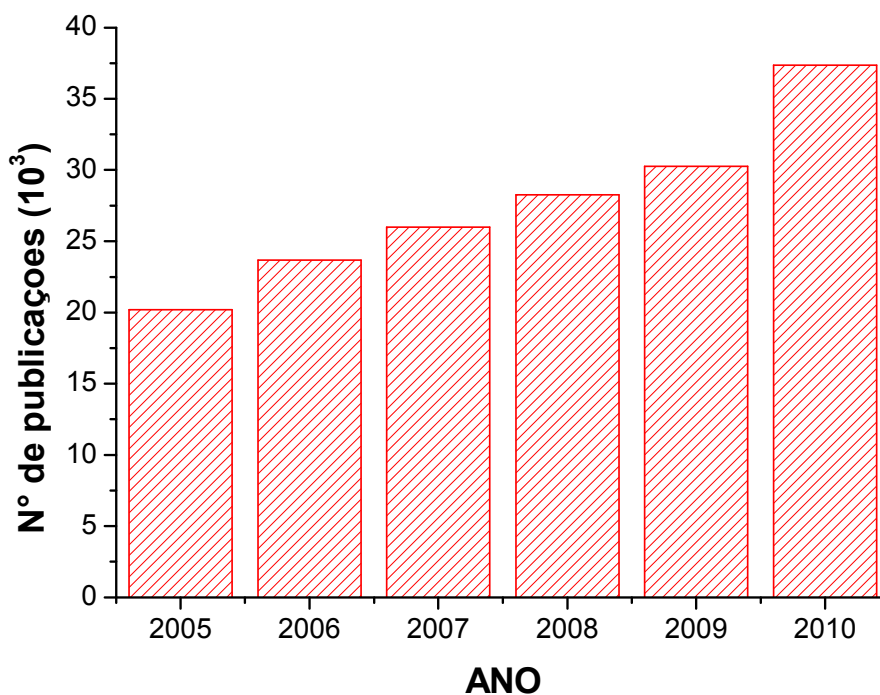
Sensores químicos permitem a coleta de dados e a obtenção de informações com manipulação mínima do sistema estudado. Estes dispositivos possuem características particulares que os distinguem de métodos instrumentais de largo porte, os quais, por sua vez, são cada vez mais precisos, sensíveis e seletivos, mas não permitem a obtenção de informações *in situ* e em tempo real (Araújo, 2009).

Nestas condições experimentais, dados são facilmente obtidos com sensores e mesmo que as medidas não tenham precisão e exatidão comparáveis às dos métodos instrumentais, em muitas ocasiões têm-se elementos suficientes para diagnosticar o sistema em estudo. Características vantajosas também inerentes ao uso de sensores químicos referem-se à portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo.

Fica evidente, que dentre os sensores químicos, há várias classificações possíveis às quais podem se basear no tamanho, tipo de aplicação ou mecanismo de transdução da resposta. Assim, de acordo com o banco de dados do SciVerse®

Science Direct, aproximadamente 165.000 artigos científicos foram publicados contendo a palavra-chave “sensor” and “sensors”, entre os anos 2005 e 2010 (Figura 3). Estes trabalhos referem-se a investigações com sensores de diversos tipos e incluem transdução potenciométrica, amperométrica, piezométrica, óptica, térmica, condutométrica, entre outras, ratificando mais uma vez a importância do campo de desenvolvimento de sensores.

**Figura 3 -Número de publicações de artigos científicos em revistas com política editorial seletiva, usando como palavra-chave “sensor” ou “sensors” entre os anos de 2005 a 2010, SciVerse® Science Direct.**



Fonte: Science Direct, 2011.

Diante do que foi colocado a respeito dos sensores químicos, verifica-se que o tópico é de alta complexidade e a área científica muito fértil, não sendo possível, nesse trabalho, o seu aprofundamento.

Nessa dissertação dar-se-á maior ênfase ao desenvolvimento de dispositivos que utilizam o transdutor eletroquímico (amperométrico e voltamétrico), particularmente, para a determinação de coenzimas, como por exemplo, a

nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), bem como as devidas justificativas para sua escolha.

### 1.5 Importância da detecção do NADH

A detecção do NADH em fluidos biológicos é particularmente importante porque permite a determinação indireta de várias substâncias não eletroativas presentes *in vivo* (BARTHUS *et al.*, 2005).

Um aspecto importante do processo de oxidação e redução enzimáticas envolve a transferência de átomos de hidrogênio. Esta transferência é mediada por coenzimas (substâncias que atuam junto com as enzimas). Entre estas temos o NADH, o qual atua por meio de doação de um átomo de hidrogênio situado no anel nicotinamídico, que, em sua forma oxidada assume a forma de um sal de piridínio, como podemos ver na figura 4b (MICHAEL e DAVID, 2005).

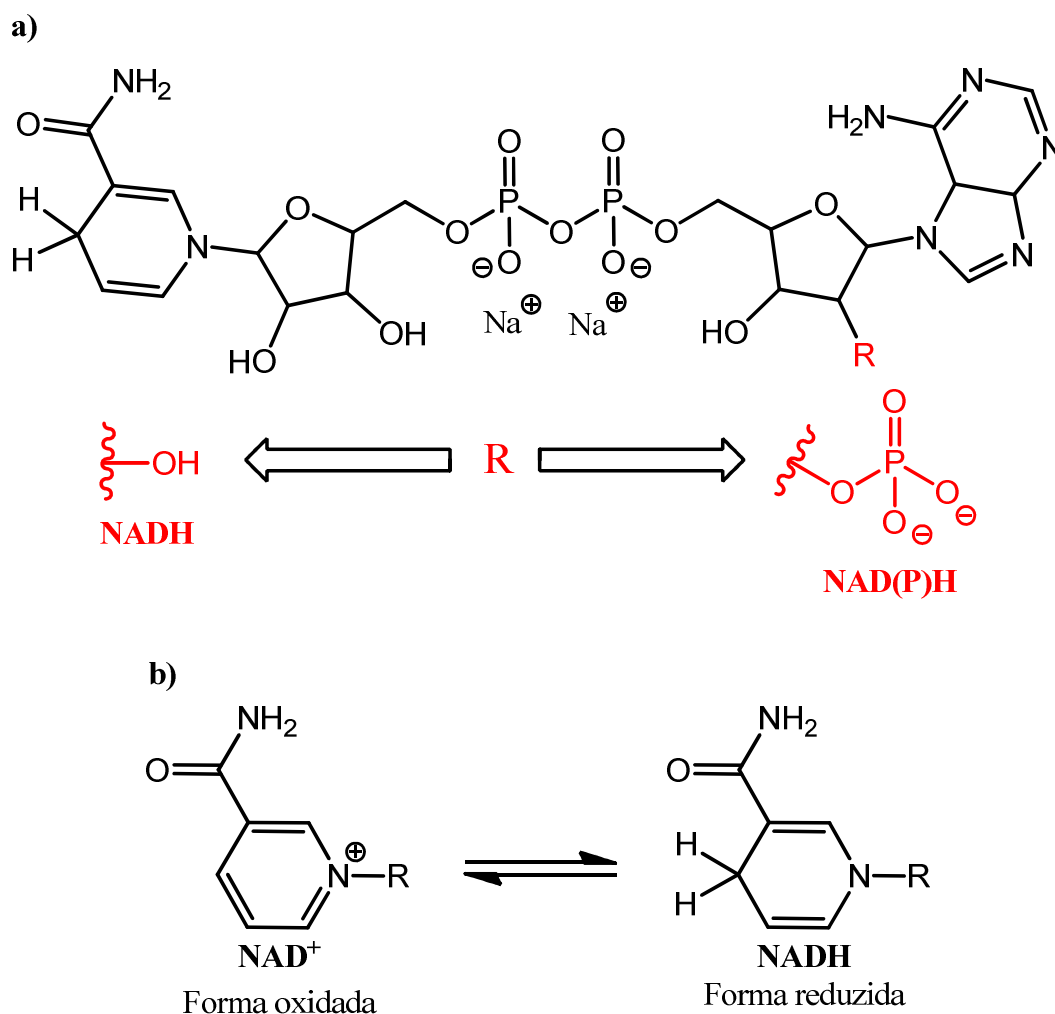
As formas reduzidas da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e da NADP(H) atuam em processos de transferência de elétrons. A diferença estrutural entre elas pode parecer trivial, porém, a diferença em termos de função é bem diferente. NADH participa em reações catabólicas, reações que “quebram” moléculas com a liberação de energia; enquanto NAD(P)H participa de reações anabólicas - reações que consomem energia, a fim de “criar” ou sintetizar moléculas maiores.

O NADH é mais conhecido por seu papel na respiração celular, enquanto que NADPH é especialmente importante na fotossíntese, bem como em processos de sinalização celular.

Para se ter uma idéia da importância destas coenzimas, aproximadamente 500 desidrogenases são dependentes destas coenzimas, onde 250 são dependentes do NADH e 250 do NAD(P)H. Em virtude disso, um grande número de pesquisas visando o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de NADH tem sido realizado, a figura 4 mostra as estruturas químicas do NADH e NAD(P)H.



Figura 4.– a) Estruturas químicas do NADH e NAD(P)H. b) Reação redox do NADH.



Fonte: Autor, 2011

A oxidação eletroquímica de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), figura 4b, é de grande interesse. Eletroquimicamente falando, quando o NADH é oxidado a  $\text{NAD}^+$  fornece um sinal em um potencial muito positivo, o que não permite o uso de eletrodos de mercúrio (MOIROUX *et al.*, 1978). A possibilidade de usar outros eletrodos, quando não modificados resolve o problema anterior, porém, em eletrodos não modificados o sinal anódico ocorre em potencial superior a +0,5 V, o que resulta em uma redução da seletividade da oxidação eletroquímica do NADH, uma vez que, em potenciais tão altos, outras espécies químicas eletroativas também podem ser oxidadas (FABREGAS e PRIETO-SIMÓN, 2004).

Além dos problemas citados acima outro problema é o bloqueio do eletrodo-passivação. Isto pode ocorrer por meio da formação de dímeros, que podem ser

gerados a partir do  $\text{NAD}^+$  produzido. Estes dímeros adsorvem na superfície do eletrodo causando o seu bloqueio e consequente perda de sensibilidade, sendo assim a procura por materiais que possam oxidar o NADH em potenciais mais baixos, sem perda da sensibilidade tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores.

A eletro-oxidação de NADH por meio de mediadores não é tão simples, uma vez que depende da natureza do mediador, podendo assim apresentar-se em basicamente três formas (KATAKIS *et al.*, 1997 e LOBO *et al.*, 1997):

- (i) Envolver a formação de um complexo intermolecular entre o NADH e o mediador como no caso dos corantes redox;
- (ii) Ocorrer transferência líquida de um hidreto como, por exemplo, em *orto* e *para*-quinonas e algumas diaminas aromáticas;
- (iii) Envolver duas etapas consecutivas de transferência de elétrons, com a transferência de prótons ao solvente, como, por exemplo, em alguns polioxometalatos.

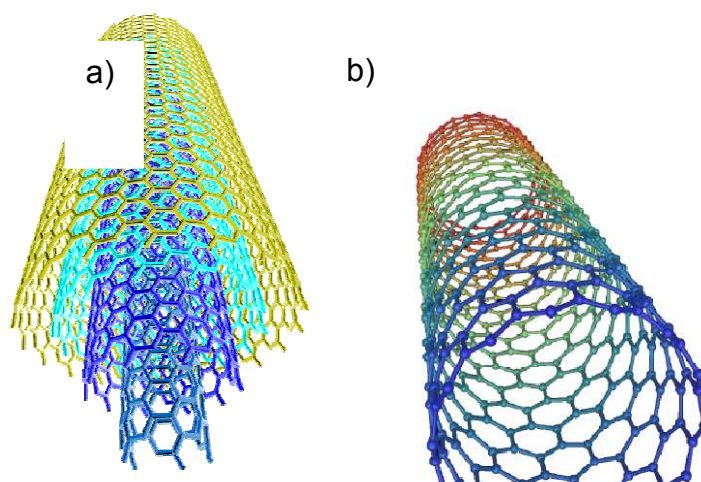
A eletrooxidação de NADH evoluiu muito com a utilização de nanotubos de carbono, e a funcionalização destes materiais é uma das formas mais utilizadas na modificação de eletrodos para o desenvolvimento de sensores, principalmente porque estes possuem propriedades e características especiais que justificam este grande emprego como veremos a seguir (KUMAR e CHEN, 2008; WANG, 2005).

## **1.6 Nanotubos de carbono :importância e diversidade**

Os nanotubos de carbono (NTCs) foram obtidos por Iijima em 1991, como subproduto da síntese de fulerenos. Os nanotubos de carbono (CNTs) são as únicas estruturas tubulares de diâmetros nanométricos com uma grande razão comprimento/diâmetro. Eles são divididos em dois grandes grupos: nanotubos de carbono de parede simples única (single walled carbon nanotubes–SWCNT), figura 5a; e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (multiwalled carbon nanotubes–

MWCNT), Figura 5b. Os de parede simples podem ser vistos como uma folha de grafeno enrolada em certa direção, formando um cilindro, que é a parede lateral, e outra região que fecha suas extremidades, a qual se assemelha a um corte das estruturas do fulereno onde os carbonos estão em anéis pentagonais e hexagonais. A depender da direção que a folha que constitui sua parede lateral é enrolada, estes nanotubos apresentarão propriedades tanto químicas quanto físicas diferentes, e esta direção de enrolamento juntamente com o diâmetro do tubo são as principais responsáveis pelo espectro de propriedades destas nanoestruturas.

**Figura 5 -Representação esquemática: (a) MWCNT e (b) SWCNT.**



Fonte: Abril, 2011.

Devido às excepcionais propriedades eletrônicas e ópticas, alta resistência mecânica e alta condutividade térmica, os nanotubos de carbono possuem uma infinidade de aplicações diretas, caracterizando-se como um material altamente estratégico (WANG, 2005). Entre as aplicações dos NTCs pode-se citar a utilização como catalisadores (PAN *et al* 2007)] materiais compósitos (CALVERT, 1999) sensores, displays de emissão de campo, pontas para microscópio de força atômica, filmes condutores, materiais nanobiotecnológicos e dispositivos nanoeletrônicos.

Por possuir um tamanho extremamente reduzido, alta condutividade, alta resistência mecânica e ser extremamente elástico, os NTCs se caracterizam como um material fundamental na construção de eletrodos.

A literatura mostra que os NTCs podem transportar correntes superiores a  $10^9$  Acm<sup>-2</sup>, enquanto a densidade de corrente para eletrodos metálicos se encontra em aproximadamente  $10^5$  A cm<sup>-2</sup>(YAO *et al.*, 2000)

A maioria do que se conhece sobre as propriedades de transporte dos NTCs vem de experimentos utilizando SWCNTs isolados ou agregados em feixes. Esses experimentos sugerem que os SWCNTs metálicos apresentam boa condutividade, através de vacâncias extremamente grandes ao longo do tubo. SWCNTs semicondutores por outro lado, possuem uma maior resistência, onde experimentos sugerem que o transporte ocorre não somente por difusão, mas é limitado por uma série de barreiras ao longo do tubo. Já para os MWCNTs, essa interpretação se torna ainda mais complexa, pois ocorre uma interação entre as paredes dos tubos, sendo que estudos indicam tanto transporte difusional como balístico. (BACHTOLD *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2009). As excepcionais propriedades eletrônicas dos NTCs conferem a esse material, quando usado como eletrodo, a habilidade de atuar como mediador em reações onde ocorre a transferência de elétrons envolvendo espécies eletroativas em solução. MWCNTs foram utilizados primeiramente para essa finalidade, atuando na promoção de uma reação bioeletroquímica (DAVIS *et al.*, 1997). Eletrodos utilizando SWCNTs também foram construídos com sucesso e apresentaram excelentes propriedades eletroquímicas (CAMPBELL e CROOKS, 1999).

A utilização de NTCs como eletrodo vem crescendo significativamente, principalmente no que diz respeito à sua utilização como substrato e agente modificador em eletrodos quimicamente modificados.

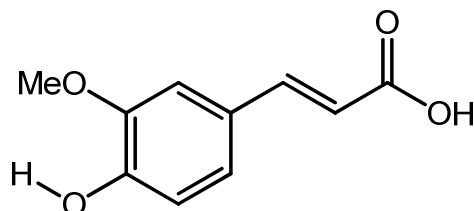
No entanto apesar das grandes vantagens apresentadas acima, os nanotubos não suprem todas as necessidades em uma área tão crescente e promissora como a área de eletroanalítica, que a cada dia tem maiores desafios, principalmente com o aumento principalmente nos interesses analítico-ambientais e analítico-biológicos, que requerem altas precisão e exatidão, bem como, o crescente número de analitos de interesse. Neste ponto, os EQMs surgem como uma ferramenta eletroanalítica que se propõe a resolver ou amenizar e abranger tais dificuldades. Os nanotubos de carbono não oferecem todo este espectro de vantagens. Eles, por exemplo, reduzem os sobrepotenciais de oxidação do NADH a aproximadamente 400 mV,

mas outras substâncias podem sofrer reações em potencial ainda tão elevado, e ainda apesar de diminuir a passivação neste potencial, esta ainda continua sendo um problema. Sendo assim, outra alternativa é o uso de mediadores redox – substâncias que podem facilitar o processo de oxi-redução de forma catalítica.

## 1.7 Ácido Ferúlico

Ácido ferúlico, ácido-4-hidroxi-3-metoxicinâmico (AF), Figura 6, é um fenol muito encontrado no tecido de plantas. Este ácido é um constituinte bioativo de muitos alimentos, tais como, grãos, frutas cítricas, banana, brócolis, entre outras. Além de ser aprovado como um aditivo conservante/antioxidante no Japão, seu sal de sódio é usado na China para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrais (WANG e OU-YANG, 2005).

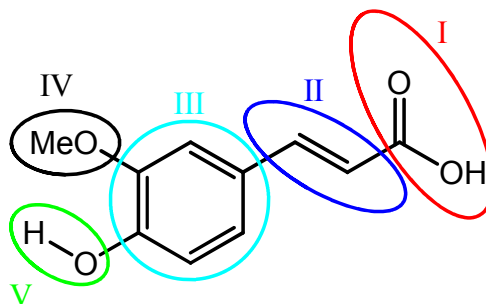
Figura 6 – Ácido Ferúlico. Fonte:



Fonte: Autor, 2011

O ácido ferúlico foi primeiro isolado de uma resina comercial em 1866, mas só foi sintetizado em 1925 (GRAF, 1992), já seus efeitos biológicos começaram a ser notados em 1970, quando pesquisadores japoneses descobriram suas propriedades antioxidantes (YAGI e OHISHI, 1979). Essa propriedade antioxidante é consequência principalmente de seu núcleo fenólico e sua cadeia lateral conjugada, a qual estabiliza por ressonância o radical formado. Desta forma, AF pode ser benéfico no tratamento e/ou prevenção de desordens ligadas ao estresse oxidativo, como doença de Alzheimer, diabetes, câncer, hipertensão e aterosclerose.

Figura 7 – Subunidades estruturais do ácido ferúlico. Fonte: (Autor, 2011).

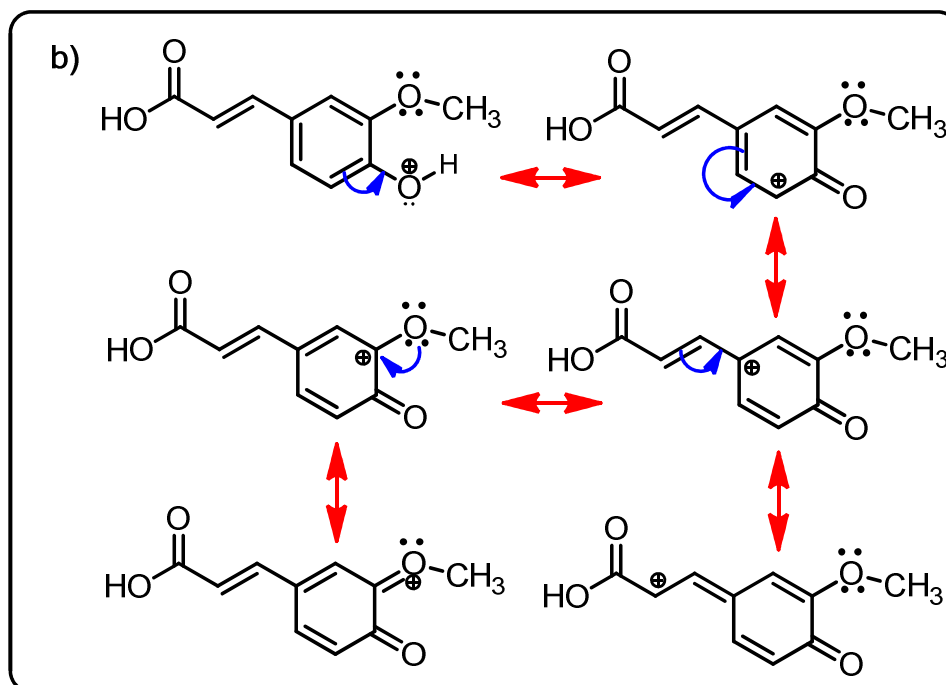
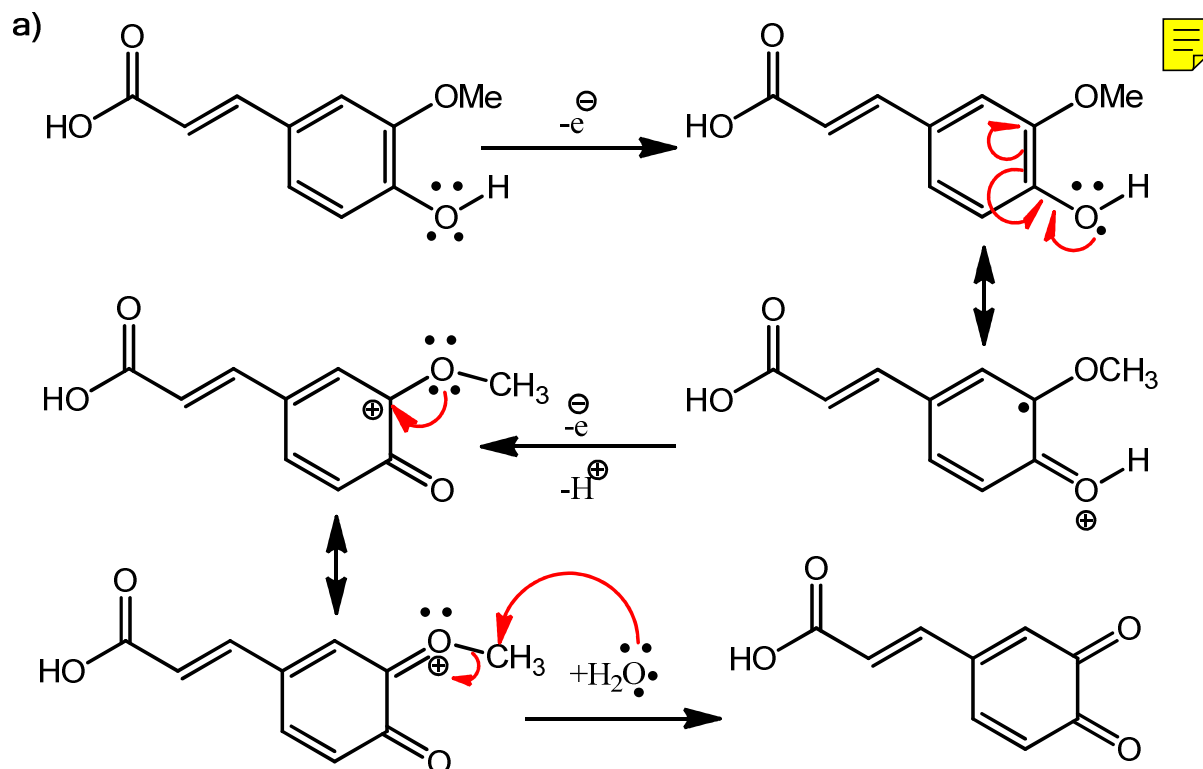


Fonte: Autor, 2011

Apesar de possuir uma estrutura química relativamente simples, o que o viabiliza como um bom candidato a mediador, o AF possui subunidades estruturais químicas estratégicas. Estas subunidades, figura 7, podem desempenhar papéis fundamentais na confecção de um eletrodo quimicamente modificado:

- I) O grupo carboxila é fundamental, pois permite a introdução da enzima requerida;
- II) A dupla ligação permite a conjugação entre a parte aromática e a carboxila ajudando a estabilizar espécies transientes formadas, o que é importante, pois diminui o sobrepotencial de oxidação-redução;
- III) O anel aromático, altamente conjugado pode estabilizar radicais e cátions formados, possibilitar ainda a formação de polímeros e conferir alta estabilidade;
- IV) A hidroxila fenólica localizada na posição *para*, portanto conjugada com II e I, pode perder elétrons de forma relativamente fácil, para constituir um possível par redox;
- V) A metoxila em *orto* à hidroxila possui pares de elétrons não ligantes e, portanto, em conjugação com possíveis espécies deficientes em elétrons que se formam a partir da hidroxila, torna-se um bom nucleófilo, que, carregado positivamente, sofre ataque nucleofílico por uma molécula de água, com quebra do éter e formação de uma *orto*-quinona, figura 8.

Figura 8 – Esquema a) mostrando o mecanismo de formação da quinona derivada do ácido ferúlico, b) estabilização da espécie catiônica.



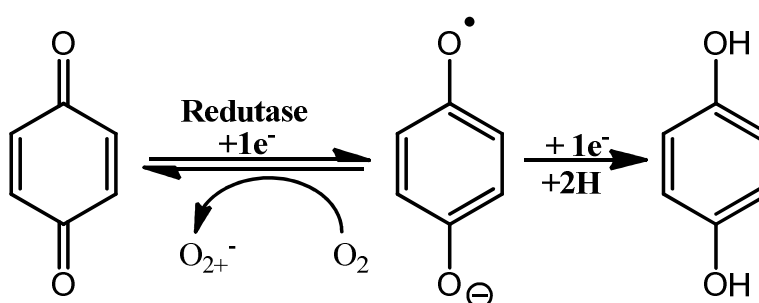
Fonte: Autor, 2011

### 1.7.1 Eletroquímica de quinonas

Quinonas são um dos mais importantes e bem estudados exemplos de pares redox em eletroquímica orgânica. As funções bioquímicas das quinonas devem-se, em grande parte à habilidade em sofrer reações redox reversíveis. Esta facilidade pode ser explicada pela formação de sistemas aromáticos.

Quinonas são espécies neutras, mas que podem ser protonadas. A protonação destas espécies facilita sua redução, tornando-as oxidantes mais fortes que sua forma não protonada. As semiquinonas ( $Q^{\bullet}$ ) são espécies geradas por redução envolvendo um elétron (Figura 9). A semiquinona não é suficientemente básica para ser protonada. Conseqüentemente, muitas semiquinonas existem como ânions radicais em pH fisiológico. Por causa da repulsão entre as cargas, um ânion radical semiquinônico é um oxidante muito mais fraco do que a quinona original. Assim, a química redox das quinonas, semiquinonas e hidroquinonas está intimamente relacionada à sua química ácido-base. Adicionalmente, semiquinonas desproporcionam, figura 9, formando as quinonas e hidroquinonas correspondentes, Seu comportamento eletroquímico básico pode ser representado pela figura 10.

**Figura 9 - Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas ( $Q^{\bullet}$ ) e hidroquinonas ( $QH_2$ ), respectivamente.**

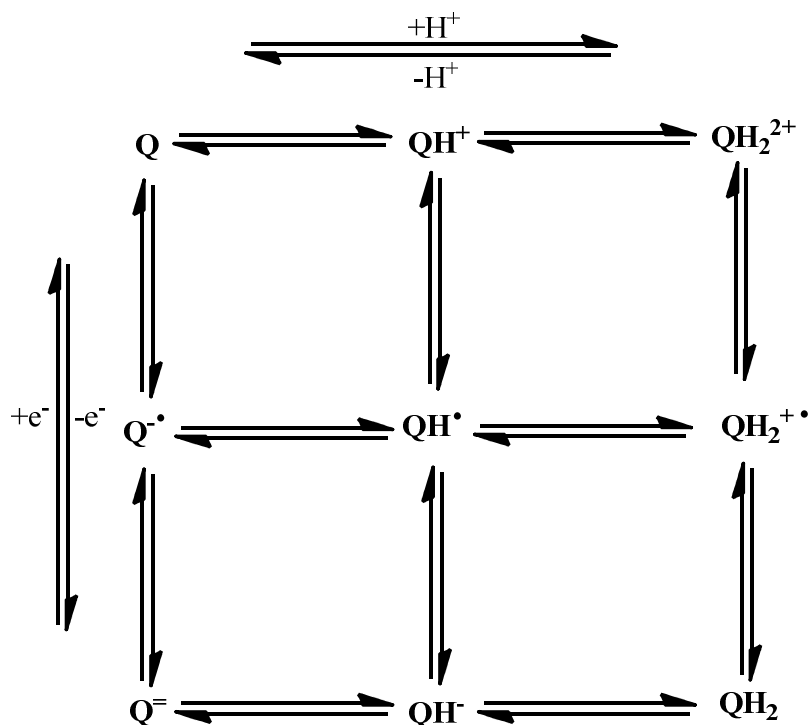


Fonte: Abreu, 2011.

A completa redução de uma quinona à sua correspondente hidroquinona requer dois elétrons e dois prótons, figura 10.



Figura 10. - Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios. Adaptado da referência



Fonte: Abreu, 2011

Quinoproteínas, enzimas que contêm um cofator quinóide tem sido estudadas extensivamente nos últimos anos, e muitas destas quinoproteínas são oxidorreduções. As quinonas desempenham bem o papel de transportadores de elétrons em processos biológicos, por exemplo, nas reações fotossintéticas e na síntese mitocondrial de ATP.

## 2 OBJETIVOS

- ❖ Estudar o comportamento eletrocatalítico da plataforma nanoestruturada ;
- ❖ Calcular os parâmetros cinéticos ( $k_{cat}$ ) da reação entre os sítios ativos e NADH;
- ❖ Determinar os parâmetros analíticos tais como o LD, LQ, sensibilidade e faixa linear de resposta frente à detecção de NADH;
- ❖ Obter uma curva analítica para a detecção de NADH;
- ❖ Verificar a estabilidade, tempo de vida útil e repetibilidade no preparo do sensor;
- ❖ Comparar os resultados obtidos com os da literatura.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes

Os seguintes reagentes foram obtidos de seus respectivos fornecedores e utilizados sem tratamento prévio: ácido ferúlico (ácido-4-hidroxi-3-metoxicinâmico) e  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), fosfato de sódio monobásico monoidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), fosfato de sódio dibásico diidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) e *N,N*-dimetilformamida (DMF) foram obtidos da Vetec, nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês *multi-walled carbon nanotubes*, *MWCNT*) foram obtidos da Sigma.

#### 3.2 Equipamentos e materiais

Um potenciostato modelo PGSTAT30 Eco Chemie da AUTOLAB (Utrecht, The Netherlands), interfaceado a um microcomputador (software: GPES 4.9), foi empregado para as medidas eletroquímicas (Figura 11). Além disso, nos estudos amperométricos para obtenção da curva analítica foi empregado um eletrodo de disco rotatório (EDR) (Figura 12), com uma velocidade de rotação otimizada (500 rpm).

Figura 11 – Fotografia de um Potenciostato modelo PGSTAT30Eco Chemie da AUTOLAB.



Fonte: Battery Research @ USM, 2011

Figura 12 – Fotografia do EDR da AUTOLAB.

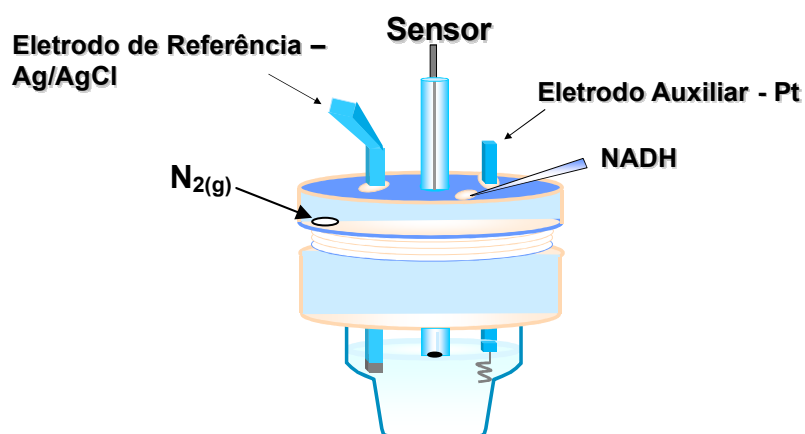


Fonte: Battery Research @ USM, 2011.

Uma célula eletroquímica com três eletrodos foi usada, sendo o eletrodo de referência um Ag/AgCl (KCl saturado), um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de carbono vítreo ( $\varnothing = 3$  mm) com a superfície modificada ou não como eletrodo de trabalho. Estes foram usados para todas as medidas (Figura 13).

As medidas foram realizadas usando 5,0 mL de solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de nitrogênio ( $\text{N}_{2(\text{g})}$ ) nas soluções, durante 10 minutos, antes das análises.

Figura 13 - Modelo esquemático da célula eletroquímica, utilizada em todos os experimentos.



Fonte: Autor, 2011.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Preparação de solução de AF

Em um eppendorf, foram pesados 8,0 mg de ácido ferúlico (41,19  $\mu\text{mol}$ ) e adicionados 2,0 mL de tampão fosfato pH 4,5 (0,20  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Esta solução foi preparada antes das polimerizações e foi utilizada durante até quinze dias. Esta solução foi armazenada em temperatura ambiente.

### 4.2 Preparação da dispersão de MWCNT

Em um eppendorf, foram pesados 2,0 mg de MWCNT (utilizado sem qualquer tratamento) e adicionado 1,0 mL de DMF. Esta mistura ficou sob agitação no ultrassom por 2 horas para uma melhor dispersão. Esta solução foi preparada antes das análises e pode ser utilizada durante um mês. Esta dispersão pode ser armazenada em temperatura ambiente e utilizada em outros experimentos.

### 4.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)

O ECV foi polido com alumina ( $\phi=0,3 \mu\text{m}$ ), lavado com água milli-Q, levado ao ultrassom por 2-3 min, em etanol, e lavado novamente com água destilada. A limpeza do eletrodo foi verificada por voltametria cíclica, utilizando uma sonda eletroquímica bem conhecida, o ferrocianeto de potássio,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  1  $\text{mmol L}^{-1}$ , em KCl 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , um sistema reversível, em potenciais adequados. Em seguida, o ECV foi lavado com água Milli-Q e secado à temperatura ambiente.

#### 4.4 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e AF

A dispersão de MWCNT, com o auxílio de uma micropipeta, foi adicionada na parte ativa do eletrodo. Uma alíquota de 5,0  $\mu\text{L}$  desta dispersão, em 5 frações sucessivas de 1,0  $\mu\text{L}$ , foi adicionada. Em cada adição, o DMF foi lentamente evaporado em estufa a 80°C durante 10 minutos para só então ser adicionado a posteriori. Para a geração da espécie eletroativa na plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT por um processo de eletropolimerização, o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT foi imerso em uma solução de ácido ferúlico, em várias concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0), sendo a concentração ótima a 0,4  $\text{mmol L}^{-1}$  e realizadas 2, 5, 8, 10, 15 ciclagens de potencial na faixa de -0,25 a 0,8 V, -0,25 a 0,575 e 0 a 0,575 *versus*. Ag/AgCl em 5,0 mL de tampão fosfato pH = 4,5, em velocidade de 0,010; 0,020; 0,030; 0,040; 0,050  $\text{V s}^{-1}$ .

#### 4.5 Estudo de Eletrocatalise do ECV/MWCNT/poli-AFe NADH

O eletrodo modificado ECV/MWCNT/poli-AF foi imerso em uma solução (0,1  $\text{mol L}^{-1}$ ) de tampão fosfato pH 7,0, sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de NADH, em diferentes concentrações e o sinal destas foi comparado com o sinal do branco (ausência de NADH). Nestes experimentos, foi selecionada uma faixa de potencial entre -0,25 a 0,5 V *vs.* Ag/AgCl, por voltametria cíclica no sentido catódico, a uma velocidade de varredura de 0,005  $\text{V s}^{-1}$ .

##### 4.5.1 Determinação da área ativa

A área ativa do ECV/MWCNT/poli-AF, foi calculada, utilizando ferricianeto de potássio como sonda eletroquímica e a equação de Randles-Sevcik (Equação 1):

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D^{1/2} \nu^{1/2} C_o$$

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D^{1/2} C_o \text{ (Equação 1)}$$

Sendo  $D$  e  $C_o$  o coeficiente de difusão e a concentração do ferricianeto de potássio no seio da solução, respectivamente. Experimentos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura foram realizados no ECV/MWCNT/poli-AF, em uma solução de  $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  em  $\text{KCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . A partir das inclinações de  $I_p \text{ vs. } v^{1/2}$  e utilizando  $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 1$ , a área ativa foi então obtida, a qual apresentou um valor de  $0,11 \text{ cm}^2$  (SANTHIAGO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

#### 4.5.2 Estudo da estabilidade e tempo de vida do sensor

Para avaliar a estabilidade do sensor, várias medidas consecutivas foram realizadas com o mesmo eletrodo modificado e as respostas foram comparadas ao longo do tempo. Os valores de resposta obtidos inicialmente foram considerados como 100%. Já para o tempo de vida do eletrodo foram realizadas medidas com o eletrodo modificado por vários meses. Durante o período de avaliação do tempo de vida do sensor, o mesmo foi armazenado em tampão fosfato  $\text{pH} = 7$ , em temperatura ambiente.

#### 4.5.3 Estudo de repetibilidade do preparo do sensor

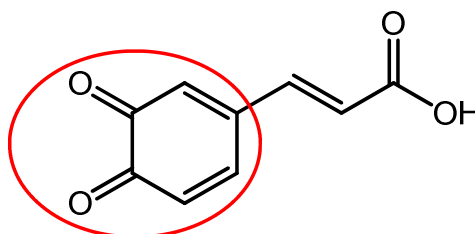
A repetibilidade do preparo do sensor foi investigada por meio da construção de 10 sensores em dias diferentes e, em seguida, o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para as medidas obtidas com os sensores.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Preparação do eletrodo modificado

Inicialmente, o eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi modificado, depositando-se 5  $\mu\text{L}$  de uma dispersão 2 mg  $\text{mL}^{-1}$  de nanotubos de carbono (MWCNT), em DMF. Posteriormente, o AF foi eletrodepositado *in situ* sobre ECV/MWCNT, a partir de uma solução 0,8 mmol  $\text{L}^{-1}$ , através de sucessivas varreduras de potencial com  $E_{\text{inicial}} = -0,25 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = 0,8 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl (10 ciclos,  $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ ) (Figura 15A). Em seguida, o ECV/MWCNT-poli-AF obtido foi lavado e imerso em uma nova solução tampão. Assim, foi possível observar a formação de um sistema quinônico (Figura 14B) com  $E^0 = 0,18 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl, a partir da oxidação irreversível do grupo funcional hidroxila eletrogerado a partir do AF, isto porque o ácido ferúlico, pode ter seu grupo metoxila quebrado e convertido a carbonila, formando assim, o sistema *orto*-quinona (GIROUSI *et al*), como mostrado na figura 14.

Figura 14 – *orto* quinona. Fonte:

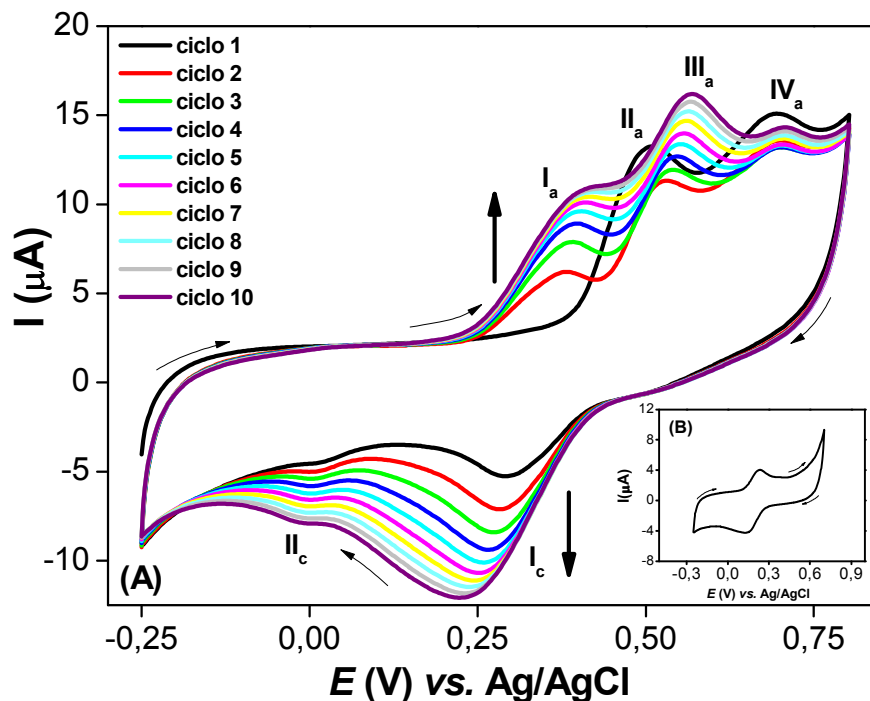


Fonte: Autor, 2011.

Esse processo de ativação *in situ* do AF apresenta uma série de vantagens e perspectivas, tais como (i) possibilidade de formação de polímero, (ii) formação de sistema quinona, responsável pelas ondas Ia/Ic.



Figura 15 – (A) Voltamograma das 10 ciclagens na faixa de -0,25 a 0,8 V vs. Ag/AgCl para a polimerização e ativação do ECV/MWCNT com ácido ferúlico a  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ , em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 e  $\nu = 0,020 \text{ V s}^{-1}$  e (B) par redox eletrogerado.



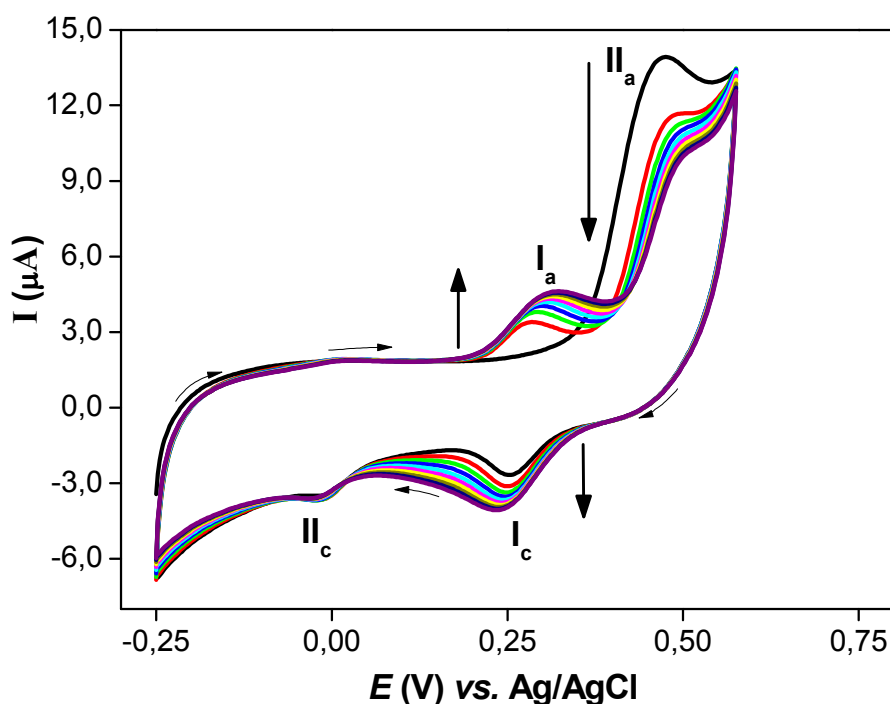
Fonte: Autor, 2011.

Como pode ser visto na primeira varredura do voltamograma da figura 15, dois picos anódicos irreversíveis foram formados, um em 0,50 e outro em 0,69 V, na mesma varredura foi gerado uma onda catódica em 0,29 V. Na segunda e subsequentes varreduras, pode-se observar a formação de uma nova onda anódica, a onda reversa da onda catódica  $I_c$ , que continuou a ser formada nas varreduras posteriores, constituindo assim um sistema redox bem definido, o qual não desaparece quando o eletrodo é lavado e transferido a uma nova solução tampão livre de AF, o que indica a permanência do novo material formado em superfície.

No intuito de otimizar o tempo de ativação *in situ* da fase sensora do eletrodo modificado e a eficiência eletrocatalítica na presença de NADH, bem como avaliar a importância das espécies eletrogeradas nas varreduras sucessivas de potencial apresentadas nos voltamogramas da Figura 15, foram selecionadas estrategicamente algumas faixas de potencial.


Neste sentido, o primeiro corte restringiu a janela de potencial a uma faixa de -0,250 a 0,575 V vs. Ag/AgCl, como pode ser observado na Figura 16. A partir da Figura 16, verifica-se a ausência do pico IVa, bem como do pico IIIa, o qual pode estar relacionado ao produto eletrogerado do pico IVa. Por outro lado, embora a faixa de potencial tenha sido restringida, o pico correspondente a IIc ainda é observado. Além disso, a fase sensora apresentou melhor resposta eletrocatalítica para a detecção de NADH, bem como uma melhora na estabilidade do poli-AF eletrogerado *in situ* sobre a plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT.

Figura 16 – voltamograma das 10 ciclagens na faixa de -0,25 a 0,575 V vs. Ag/AgCl para a polimerização e ativação do ECV/MWCNT com ácido ferúlico 0,8 mmol L<sup>-1</sup>, em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5 e  $\nu = 0,020$  V s<sup>-1</sup>.

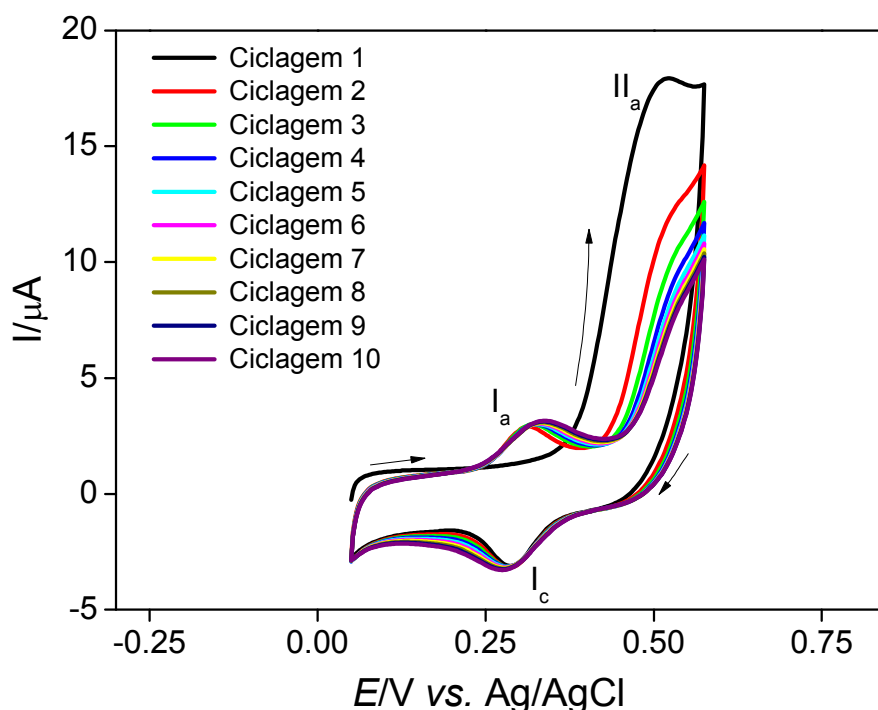


Fonte: Autor, 2011.

Após ser feita outra restrição da janela de potencial, de 0,05 a 0,575 V vs. Ag/AgCl, Figura 17, verificou-se ausência do pico IIIc. Além disso, constatou-se que não só o par redox I<sub>a</sub>/I<sub>c</sub> era necessário para o processo de catálise, mas o pico III<sub>c</sub> também era de fundamental importância para a obtenção da estabilidade da

resposta catalítica frente à detecção de NADH. Particularmente, quando não era gerada a onda  $III_c$  a segunda varredura na catálise frente ao NADH já perdia a resposta quase que por completo, o mesmo ocorrendo quando o eletrodo era lavado. Por essa razão, a condição relacionada à primeira restrição da faixa de potencial foi selecionada para os estudos seguintes, levando-se, portanto, em consideração a estabilidade e eficiência na resposta eletrocatalítica, na presença do analito alvo. Como podem ser observados, os processos interfaciais, neste trabalho, são bastante complexos, sugerindo, a necessidade de lançar mão de técnicas de superfície na tentativa de compreender a dinâmica dos eventos eletroquímicos, embora se reconheça que o par redox ativo na presença de NADH seja o  $I_a/I_c$ . Além disso, o par redox eletrogerado  $I_a/I_c$ , a partir da oxidação do grupo hidroxila pode ser corroborado através de estudos reportados na literatura científica com compostos similares (MILCZAREK, 2009; PETEKM  STANLEY BRUCKENSTEIN, 1973)

**Figura 17 – Voltamogramas das 10 ciclagens na faixa de 0,05 a 0,575 V vs. Ag/AgCl para a polimerização e ativação do ECV/MWCNT com ácido ferúlico a  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ , em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 e  $v = 0,020 \text{ V s}^{-1}$ .**



Fonte: Autor, 2011.

## 5.2 Otimização dos parâmetros de ativação

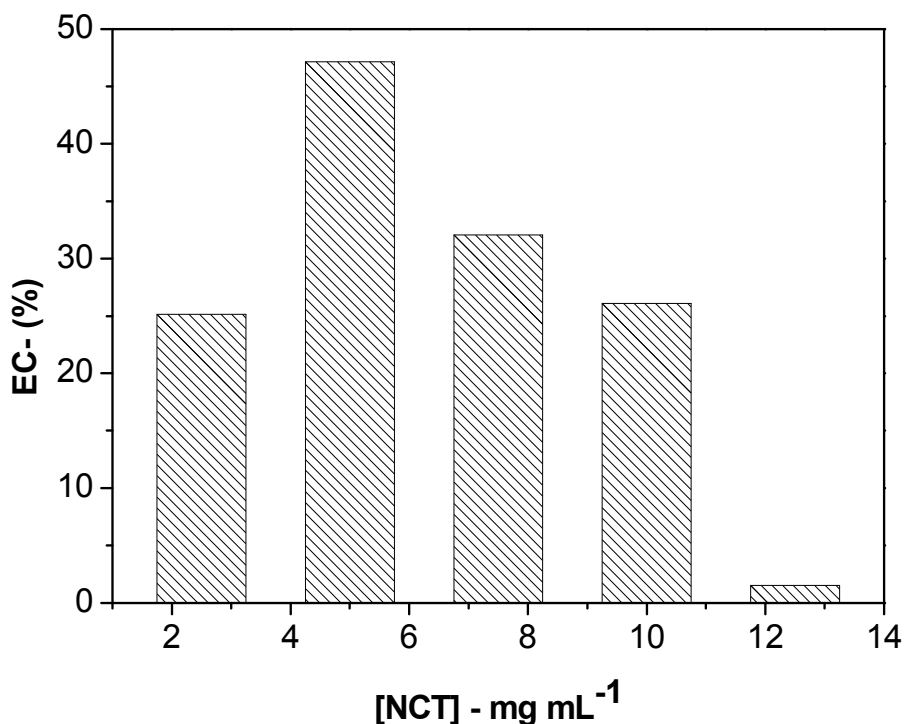
Para a preparação do eletrodo modificado, inicialmente foi necessário a otimização de alguns parâmetros que influenciam na resposta do eletrodo. A quantidade de nanotubos de carbono foi o primeiro a ser otimizado. Para isto, foram preparados eletrodos com diferentes quantidades de nanotubos. Cada um destes eletrodos foi submetido a 10 ciclagens na faixa de potencial de -0,25 a 0,575 V para a polimerização do AF, na plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT, usando uma solução do ácido ferúlico  $0,4\text{mmol L}^{-1}$ , em solução tampão fosfato  $0,1\text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 e uma velocidade  $v= 0,020\text{ V s}^{-1}$ .

Para avaliar os melhores resultados, o cálculo da eficiência catalítica (EC) foi usado, utilizando-se a equação abaixo (GLIGOR *et al.*, 2009).

$$EC = \frac{(Ip)_{NADH\text{conc}X} - (Ip)_{NADH\text{conc}0}}{(Ip)_{NADH\text{conc}0}} \text{ (Equação 2)}$$

Sendo, o  $(Ip)_{NADH\text{conc}X}$  a corrente de pico com NADH na concentração X, neste caso  $0,4\text{ mmol L}^{-1}$  enquanto  $(Ip)_{NADH\text{conc}0}$  é a corrente de pico sem o NADH. As varreduras foram realizadas em tampão fosfato  $0,1\text{ mol L}^{-1}$  a uma velocidade de  $5\text{ mV s}^{-1}$ . Os dados exibidos são os da segunda varredura, e como se observa no gráfico abaixo, a EC variou não linearmente entre valores em torno de 0,3 a 48% quando a quantidade de nanotubos variou de  $0,2$  a  $12\text{ mg mL}^{-1}$ , sendo constatado que a melhor EC foi a  $0,5\text{ mg mL}^{-1}$ , Figura 18.

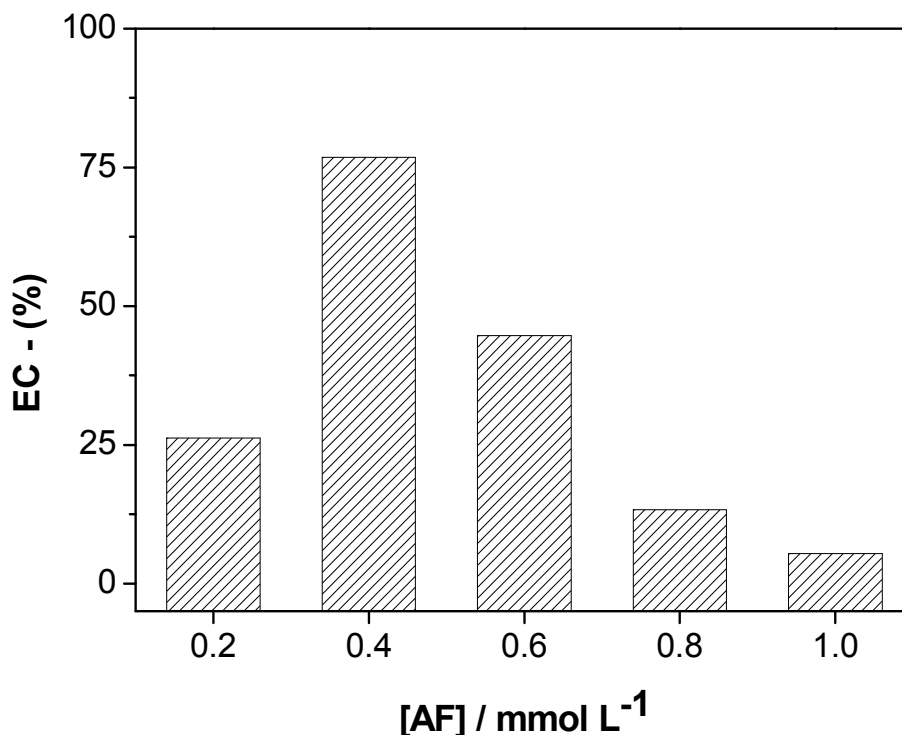
Figura 18 - Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-AF frente ao NADH, variando a quantidade de nanotubos da plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT.



Fonte: Autor, 2011.

Ainda, dispondo de equação 2, a eficiência catalítica frente à variação na concentração de ácido ferúlico foi calculada. Isto se deu já dispondo para a realização dos experimentos do parâmetro acima otimizado para a preparação da plataforma ECV/MWCNT/poli-AF, ou seja, a quantidade de nanotubo, a qual foi 5,0 mg L<sup>-1</sup> (0,25 mg). Nestas condições, a melhor EC quando se avaliava a concentração de AF para a ativação do eletrodo já modificado com 5,0 µg de MWCNT foi a 0,4 mmol L<sup>-1</sup>, como podemos averiguar a partir dos dados fornecidos no gráfico da Figura 19.

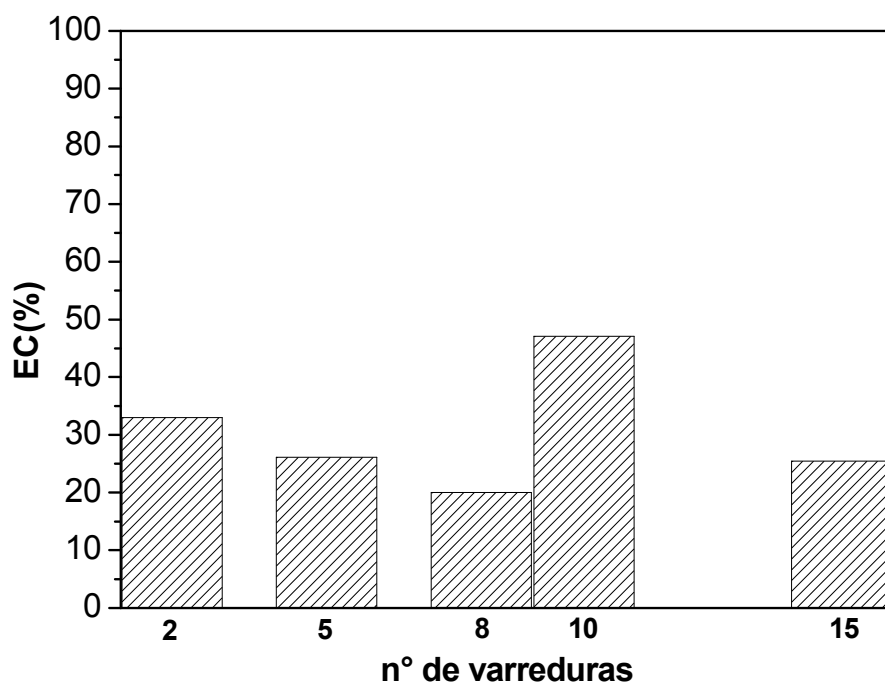
Figura 19 - Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-AF frente ao NADH, variando a concentração de ácido ferúlico usado na preparação do sistema ECV/MWCNT/poli-AF.



Fonte: Autor, 2011.

Dispondo da otimização de dois parâmetros, outro fator a ser otimizado foi o número de varreduras de potencial durante a ativação, uma vez que a espessura da camada polimérica é um fator muito importante na resposta obtida, esta não podendo ser tão espessa a ponto de dificultar o transporte de elétrons, mas tendo que possuir uma quantidade ótima do polímero formado. Destes experimentos, obtivemos variações de EC que assumiram valores bem inferiores a 48% quando foram realizados menos de 10 ciclos de varredura, atingindo o melhor valor de EC quando da realização de 10 ciclos e decaindo para 25,5%, quando da realização de 15 ciclos, Figura 20.

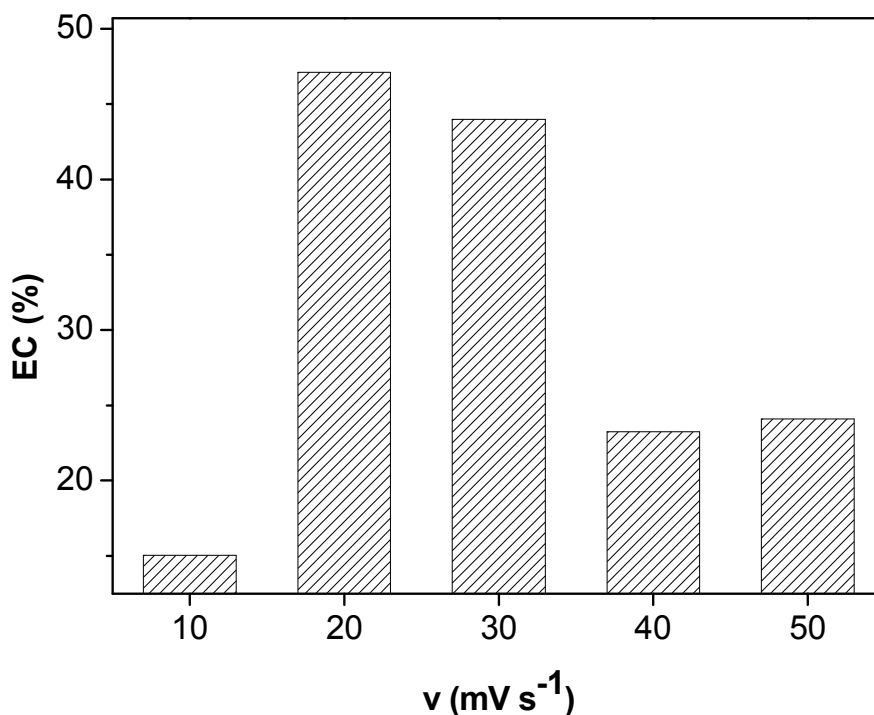
Figura 20 - Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-AF frente ao NADH, variando o número de scans usado na preparação do sistema ECV/MWCNT/poli-AF.



Fonte: Autor, 2011.

Outro fator que pode influenciar na espessura da camada de polímero depositada sob o eletrodo é a velocidade de varredura, este parâmetro também foi otimizado, onde podemos ver que a velocidade a ser empregada situa-se entre 20 e 30  $\text{mV s}^{-1}$ . Como a 20  $\text{mV s}^{-1}$  apresentou um valor levemente melhor, esta foi a velocidade selecionada, Figura 21.

Figura 21 - Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-AF frente ao NADH, variando a velocidade de ciclagem usada na preparação do sistema ECV/MWCNT/poli-AF.

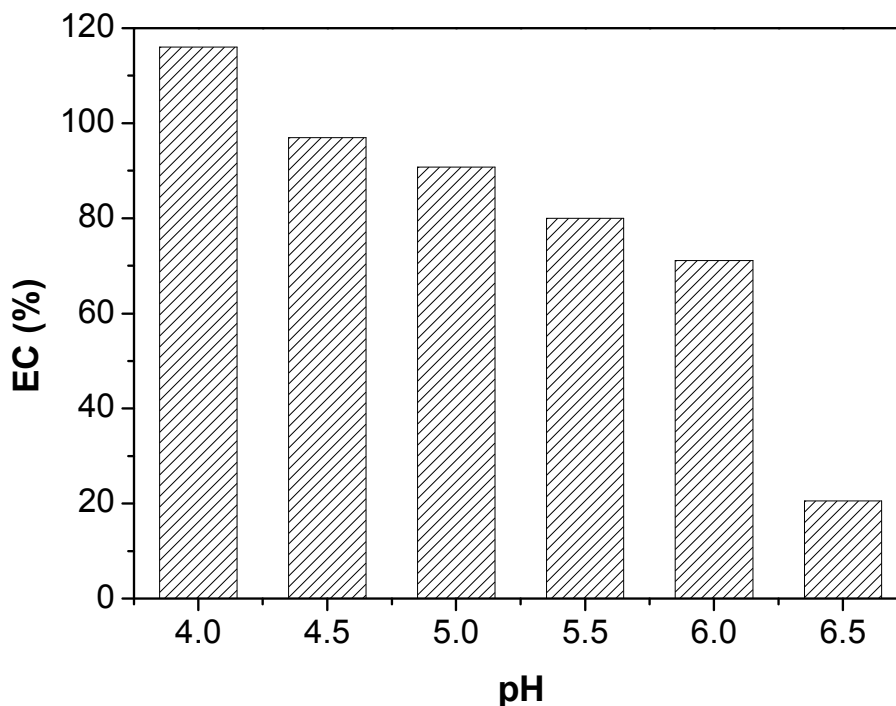


Fonte: Autor, 2011.

Como sabemos, o pH pode influenciar na força iônica, e assim na distribuição eletrônica de algumas moléculas orgânicas, alterando as reações de oxi-redução e influenciando no processo de polimerização e ativação, sendo assim, vários valores de pH foram testados, no intuito de avaliar em qual deles, a polimerização ocorria de forma a fornecer o melhor resultado para EC, e como podemos ver na Figura 22, o melhor pH de ativação foi a 4,0, porém este não apresentou resultados com alto grau de reprodutibilidade, isto provavelmente devido à solubilidade do AF, nesse valor de pH, os experimentos foram realizados em pH 4,5.



Figura 22 - Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-AF frente ao NADH, variando o pH usado na preparação do sistema ECV/MWCNT/poli-AF.



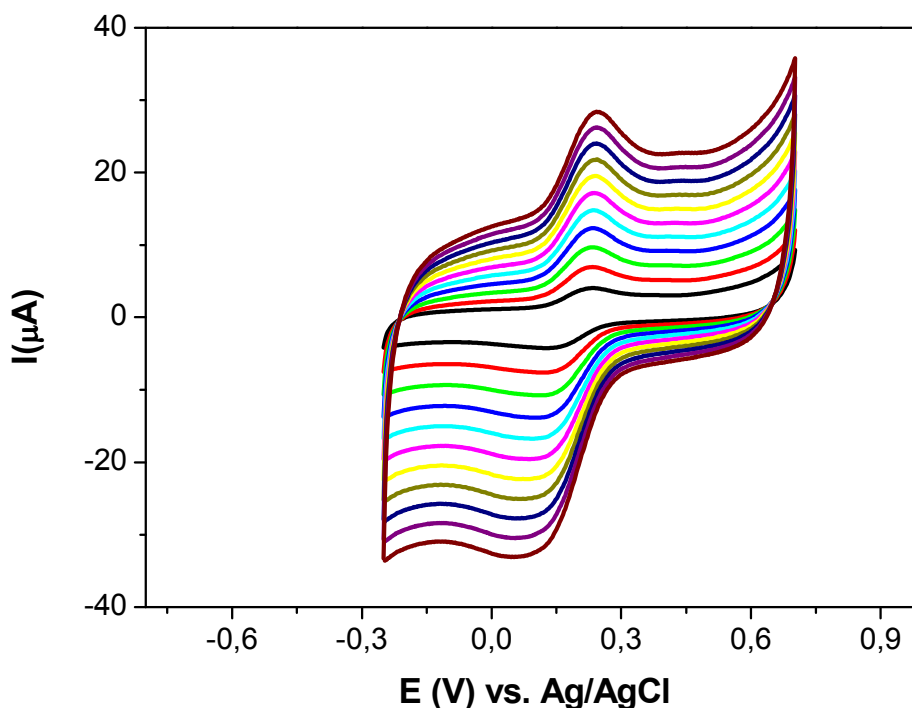
Fonte: Autor, 2011.

### 5.3 Características Cinéticas do ECV/MWCNT/poli-AF

O sucesso do processo eletrocatalítico frente à detecção da NADH depende primariamente da eficiência do mediador eletrodepositado na plataforma nanoestruturada. Assim, para garantir que a etapa limitante da reação química acoplada não seja a velocidade de formação dos estados de transição das espécies oxidada (quinona) e reduzida (hidroquinona) do mediador, são realizados estudos prévios para a obtenção do valor da constante de velocidade de transferência heterogênea de elétrons ( $k_s$ ).

Para isto, após o processo de polimerização *in situ*, a faixa de potencial do par redox foi selecionada, e usando a voltametria cíclica, as características cinéticas do ECV/MWCNT/AF foram estudadas, como pode ser observado na Figura 23

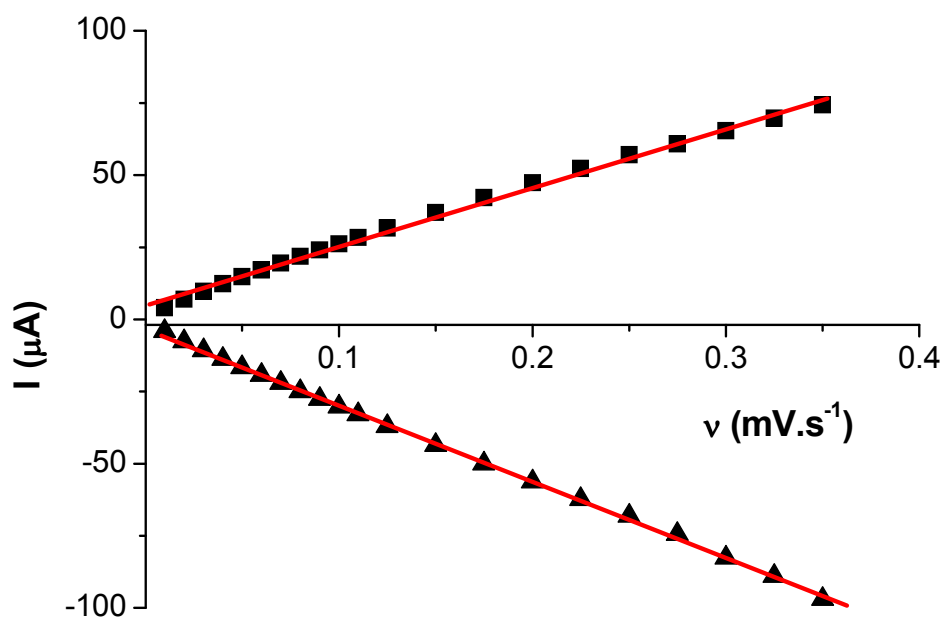
Figura 23 - Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/poli-AF em solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura (0,005- 0,100 V s<sup>-1</sup>), E<sub>inicial</sub> = -0,25 V e E<sub>λ</sub> = 0,7V, varredura no sentido anódico.



Fonte: Autor, 2011.

Os voltamogramas cíclicos representativos obtidos para o ECV/MWCNT/poli-AF são mostrados na Figura 23, para várias velocidades de varredura de potencial (0,005 – 0,10 V s<sup>-1</sup>). A observação de picos voltamétricos persistentes e bem definidos indica que o processo redox do par (quinona/hidroquinona) exibe características de espécies confinadas na plataforma nanoestruturada à base de nanotubos de carbono, o que pode ser confirmado com a correlação linear entre a corrente de pico e a velocidade de varredura (Figura 24).

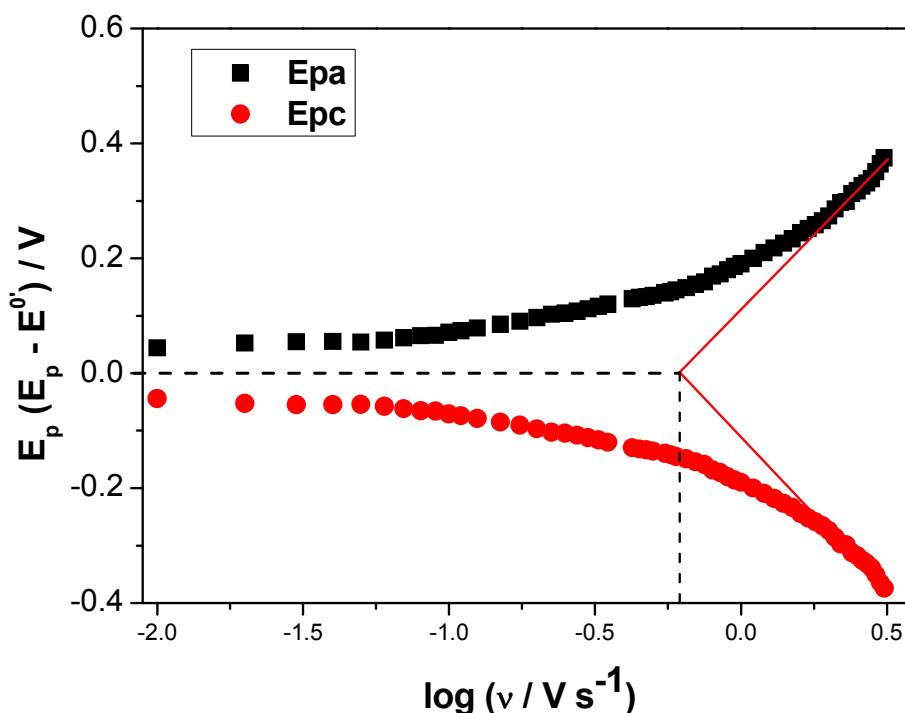
Figura 24 - Dependência da corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ), em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0.



Fonte: Autor, 2011.

Do gráfico abaixo, figura 25, observa-se que o potencial formal [ $E^{0'} = (E_{pa} + E_{pc})/2$ ] é praticamente independente da velocidade de varredura, portanto, pode-se dizer que há uma transferência de carga rápida na faixa de velocidade de varredura estudada 5-700  $mV s^{-1}$ .

Figura 25 - Gráfico de  $E_p$  vs.  $\log \nu$  a partir do voltamogramas cíclicos em varias velocidade de varreduras.



Fonte: Autor, 2011.

Por outro lado, para velocidades de varredura de potencial acima de  $700 \text{ mV s}^{-1}$ , a separação dos picos começa a aumentar, indicando uma limitação cinética na transferência de carga (Figura 25). A partir das expressões gerais derivadas por Laviron (LAVIRON, 1974), foi calculado o  $\kappa_s$  para as respostas voltamétricas de varredura de potencial para o caso de espécies eletroativas confinadas na superfície eletródica (LAVIRON, 1979).

Assim, a partir do gráfico de  $E_p = f(\log \nu)$ , verificam-se duas linhas retas com inclinações iguais a  $-2,3 RT/\alpha nF$  e  $2,3 RT/(1-\alpha)nF$  para os picos catódico e anódico, respectivamente. Para velocidades de varredura acima de  $700 \text{ mV s}^{-1}$ , os valores de  $\Delta E = (E_p - E^0)$  foram proporcionais ao logaritmo da velocidade de varredura como indicado por Laviron. Usando o gráfico e a Equação 3, os valores de  $\alpha$  e  $\kappa_s$  foram 0,5 e  $25,2 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. O  $\kappa_s$  foi calculado a partir dos valores de  $\nu_a$  e  $\nu_b$  sendo  $E_p - E^0 = 0$  (LAVIRON, 1979):

$$k_s = \frac{\alpha n F v_c}{RT} = \frac{(1 - \alpha) n F v_c}{RT} \text{ (Equação 3)}$$

A tabela 1 mostra alguns valores de  $\kappa_s$  registrados na literatura. Desta tabela podemos notar que o valor de  $\kappa_s$  obtido para o sistema (ECV/MWCNT/*poli*-AF) foi maior do que o registrado para os trabalhos descritos nesta tabela. Uma busca mais abrangente na literatura de biossensores mostra ainda que o valor de  $\kappa_s$  obtido é melhor que muitos dos trabalhos registrados na literatura, o que indica uma alta habilidade do par redox (quinona/hidroquinona) em promover a transferência de elétrons na superfície do eletrodo modificado com o sistema ECV/MWCNT/*poli*-AF.

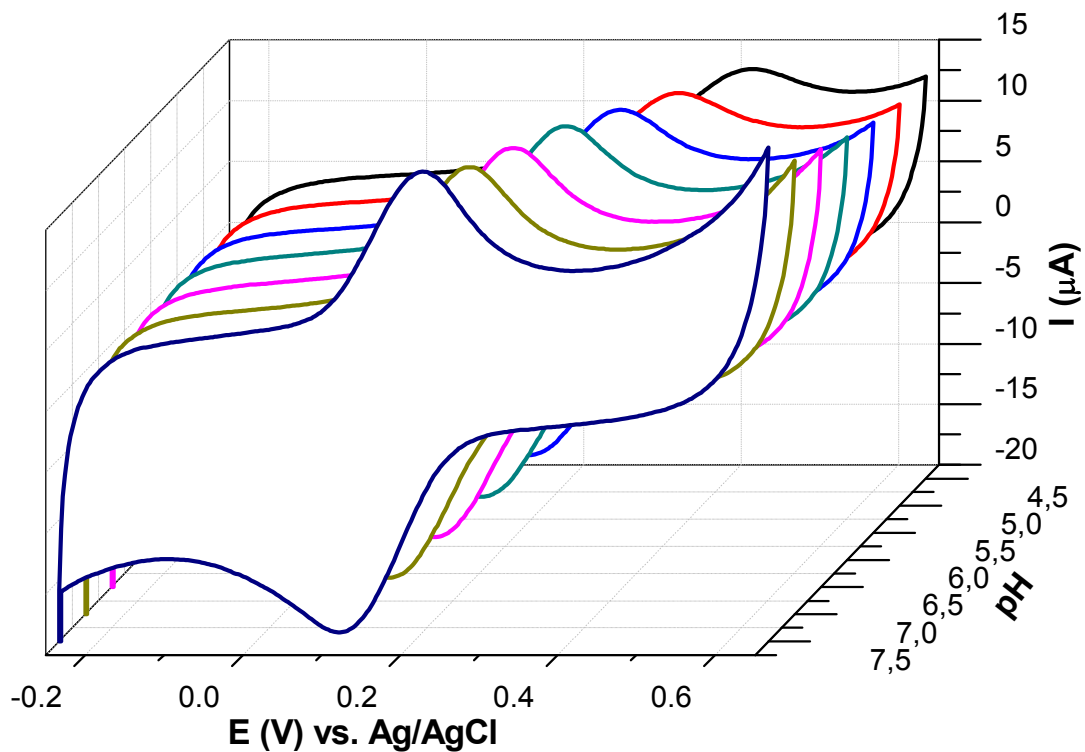
**Tabela 1** Parâmetros eletroquímicos de eletrodos modificados . Fonte: (Autor, 2011).

Plataforma	<i>n</i>	$\kappa_s$ (s <sup>-1</sup> )	Referência
ECV/CA	2	8,6	ZARE <i>et al.</i> , 1999
ECV/PCV	-	5,3	GOLABI <i>et al.</i> , 2002
EPC/DDDP-ZF	2	1,1	MUNTEANU <i>et al.</i> , 2003
EPC/NF-ZF	-	4,5	MUNTEANU <i>et al.</i> , 2004
ECV/NE	2	3,8	ZARE <i>et al.</i> , 2005
ECV/MWCNT/MB	-	5,1	ZHU <i>et al.</i> , 2007 <sup>a</sup>
ECV/Q	-	4,5	ARDAKANI <i>et al.</i> , 2007
ECV/MWCNT/RN	2	0,075	YOGESWARAN e CHEN, 2007
ECV/FeTsPc-FeT4MPyP	-	3,8	DUARTE <i>et al.</i> , 2008
NFE/PMMA-	-	13,3	MANESH <i>et al.</i> , 2008
EPC/EMIMBF <sub>4</sub>	-	0,00458	SUN <i>et al.</i> , 2009
ECV/MWCNT/CM	-	2,21	ZHENG e SONG, 2009
E Au/ MWCNT/QUIT/DA	-	0,41	GE <i>et al.</i> , 2009
EPC/MWCNT/DDF	-	2,39	FOTOUHI <i>et al.</i> , 2010
EPC/MWCNT/4-NF	2,3	9,7	LIMA <i>et al.</i> , 2009
<b>ECV/MWCNT/<i>poli</i>-AF</b>	<b>2</b>	<b>25,2</b>	<b>ESTE TRABALHO</b>

CA: Acido clorogênico; CM: Curcumina; DA: dopamina; DDDP: 16,18-dibenzo[c,1]-7,9-ditia-16,18-diazapentaceno; DDF: 6,7-diidroxí-3-metil-9-tia-4,4a-diazofluoren-2-ona; ECV: Elet. de carbono vítreo; EMIMBF<sub>4</sub>: 1-etil-3-metilimidazol tetrafluoroborato; EAu: Eletrodo de ouro; EPC: Elet. de pasta de carbono; FeTsPc: ftalocianina tetrassulfonada de ferro (II); MB: Azul de Meldola; MWCNT: nanotubos de carbono de paredes múltiplas; NE: norepinefrina; NF: nitrofluorenona; NFE: Eletrodo de nanofibras; PDDA: Policloreto de dialildimetilamônio; PMMA: polimetilmetacrilato; Q: Quinizarina; QUIT: Quitosana; RN: Vermelho neutro; ZF: fosfato de zircônio.

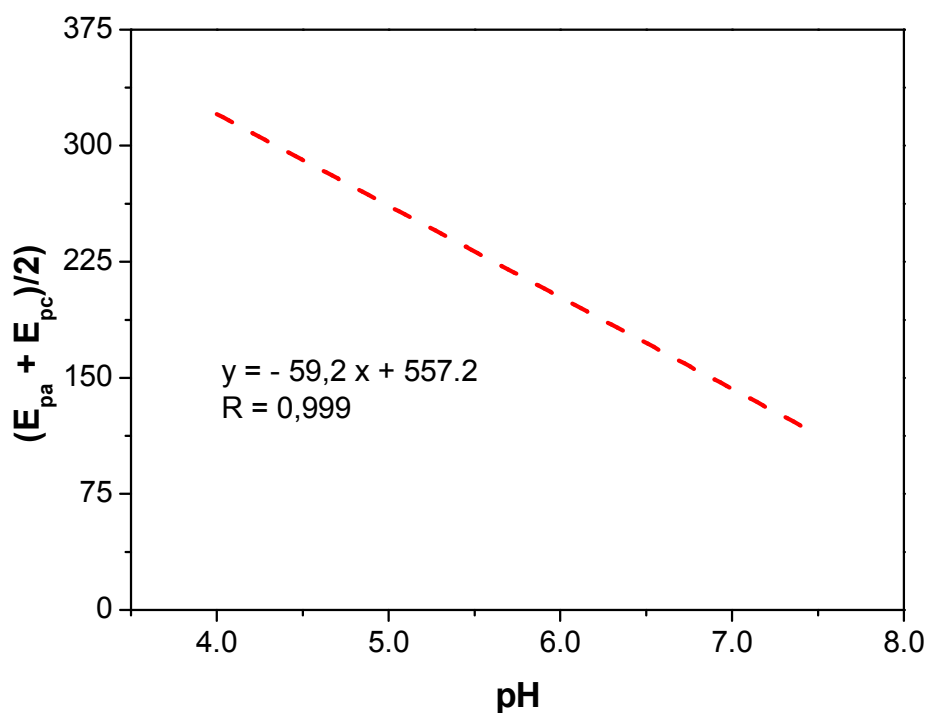
A influência do pH da solução na resposta eletroquímica na ausência de NADH, usando solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 4,5, 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 foi estudada (Figura 26). Portanto, a relação do  $E^0$  do par redox **la/lc** em função do pH da solução foi avaliada na ausência do analito, figura 27. Assim, foi possível verificar que o coeficiente angular ( $E^0/\text{pH}$ ) é de exatamente  $59,2 \text{ mV / unidade de pH}$  na faixa de pH de 4,5 a 7,5 para o par redox (Figura 27). O que condiz exatamente com o valor teórico para a razão  $e^-/H^+$  que é igual a um ( $59,2 (n_p/n_{e^-}) \text{ mV / pH}$ ), sendo  $n_p = n_{e^-}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Portanto, se considerarmos o número de elétrons igual a 2,0 (SILVA *et al.*, 2010) para o processo de interconversão (quinona/hidroquinona), bem como considerando o comportamento do potencial formal do par redox **la/lc**, em função do pH da solução, há somente uma possibilidade para o pH entre 4,5 e 7,5, ou seja, o número de prótons envolvidos neste processo deve ser também 2,0 como pode ser observado em alguns trabalhos reportados na literatura (YOGESWARAN e CHEN, 2007; SANTHIAGO *et al.*, 2009). Além disso, há, apenas, uma variação discreta da corrente de pico do par redox, com o aumento dos valores de pH da solução (Figura 26), o que mostra que independentemente do potencial hidrogeniônico do meio, há uma alta estabilidade do mediador confinado na plataforma nanoestruturada fundamentando a aplicabilidade deste sistema, em diferentes concentrações hidrogeniônicas.

Figura 26 - Efeito do pH no comportamento redox do ECV/MWCNT/poli-AF, voltamogramas obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e  $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ .



Fonte: Autor, 2011.

Figura 27 - Potencial formal ( $E^0$ ) do ECV/MWCNT/poli-AF em função do pH. Condições empregadas: solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e  $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ .



Fonte: Autor, 2011.

Após o processo de polimerização *in situ* do ácido ferúlico, a estabilidade do par redox (ECV/MWCNT/*poli*-AF) foi checada por meio de voltamogramas cíclicos sucessivos. A variação da corrente de pico, depois de estabilizada foi avaliada, com o desvio padrão relativo (DPR) como observado em vários trabalhos (LIMA *et al.*, 2008a, LIMA *et al.*, 2009, SANTHIAGO *et al.*, 2009). Assim, após 1000 ciclos foi observado um DPR menor do que 5%, ou seja, nenhuma mudança significativa foi observada nas respostas voltamétricas, sugerindo uma excelente estabilidade da plataforma nanoestruturada à base de MWCNT e AF.

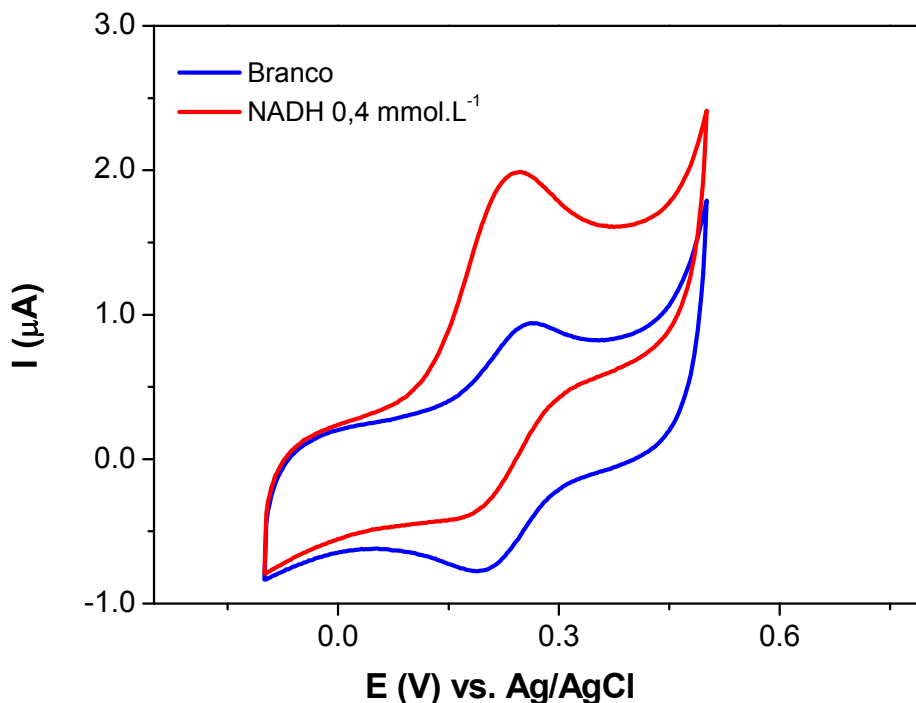
Quando o eletrodo modificado foi estocado em tampão fosfato pH 7 e no freezer, nenhuma mudança significativa foi observada por quatro meses, indicando uma boa estabilidade e repetibilidade, provavelmente devido às interações  $\pi-\pi$  que devem favorecer a adsorção na matriz, levando a uma boa estabilidade em suas respostas voltamétricas (SILVA *et al.*, 2010; SANTHIAGO *et al.*, 2009).

De maneira a verificar a atividade eletrocatalítica do par redox (quinona/hidroquinona) na presença de NADH, alguns ensaios foram realizados. Assim, a Figura 28 mostra os voltamogramas cíclicos para a plataforma nanoestruturada à base de ECV/MWCNT/*poli*-AF, em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), usando uma varredura anódica, com  $E_{\text{inicial}} = -0,1$  V e  $E_{\lambda} = 0,5$  V vs. Ag/AgCl, na ausência e na presença de NADH.

Após cada adição de NADH à solução (Figura 28), o pico de oxidação ( $I_a$ ) gradualmente aumenta de forma significativa, enquanto o pico de redução ( $I_c$ ) do mediador diminui, desaparecendo quase que por completo na presença de altas concentrações de NADH, indicando, portanto, uma eletrocatalise eficiente, como mostrado na Figura 28.



Figura 28 - Voltamogramas cíclicos para o ECV-MWCNT-*poli*-AF e MWCNT (D) na ausência e na presença de NADH. Velocidade de varredura ( $\nu$ ):  $0,005 \text{ V s}^{-1}$ . Estudos realizados em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em pH 7,0.



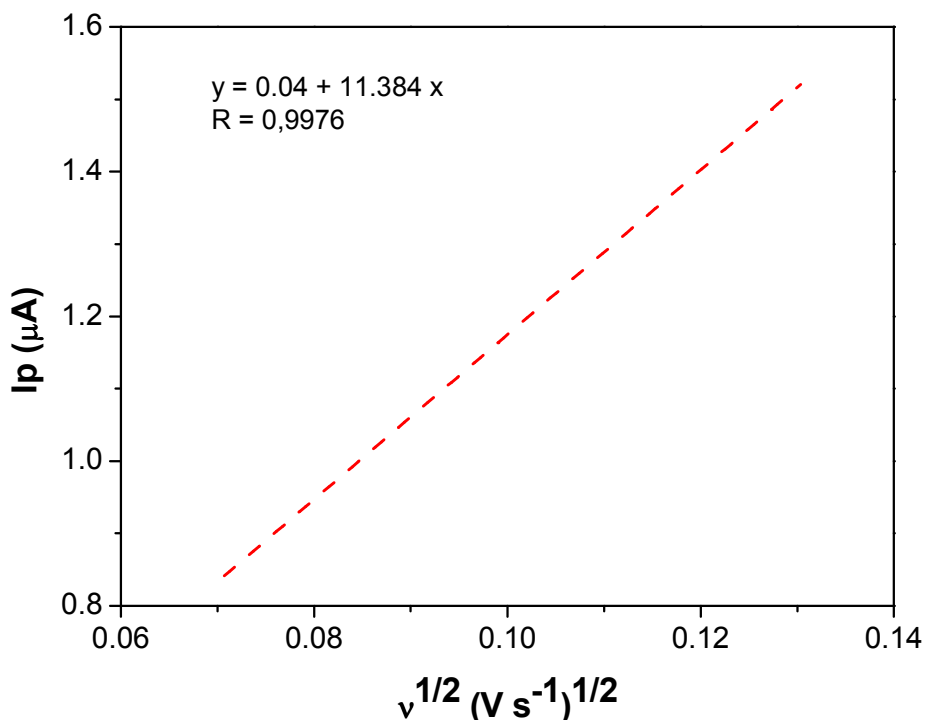
Fonte: Autor, 2011.

Além disso, se for levada em consideração a faixa de potencial selecionada para efeito de comparação, o ganho de potencial para a oxidação eletrocatalítica de NADH é de aproximadamente 200 mV vs. Ag/AgCl em relação às plataformas não modificadas, ratificando, portanto, o efeito sinérgico da plataforma nanoestruturada desenvolvida e garantindo uma maior seletividade quando de seu uso em biossensores NADH dependentes.

Com o aumento da velocidade de varredura, o pico de oxidação catalítico desloca gradualmente para potenciais mais positivos, sugerindo uma limitação cinética na reação entre os grupos eletroativos e o NADH. Por outro lado, um gráfico da corrente catalítica  $I_{pa}$  versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $\nu^{1/2}$ ) na faixa de velocidade de  $0,005$  a  $0,017 \text{ V s}^{-1}$  foi construído e resultou numa dependência linear (Figura 29), expressa pela seguinte equação:

$$I_{pa}(\mu A) = 0,04 + 11,384v^{1/2}(Vs^{-1})^{1/2} \text{ (Equação 4)}$$

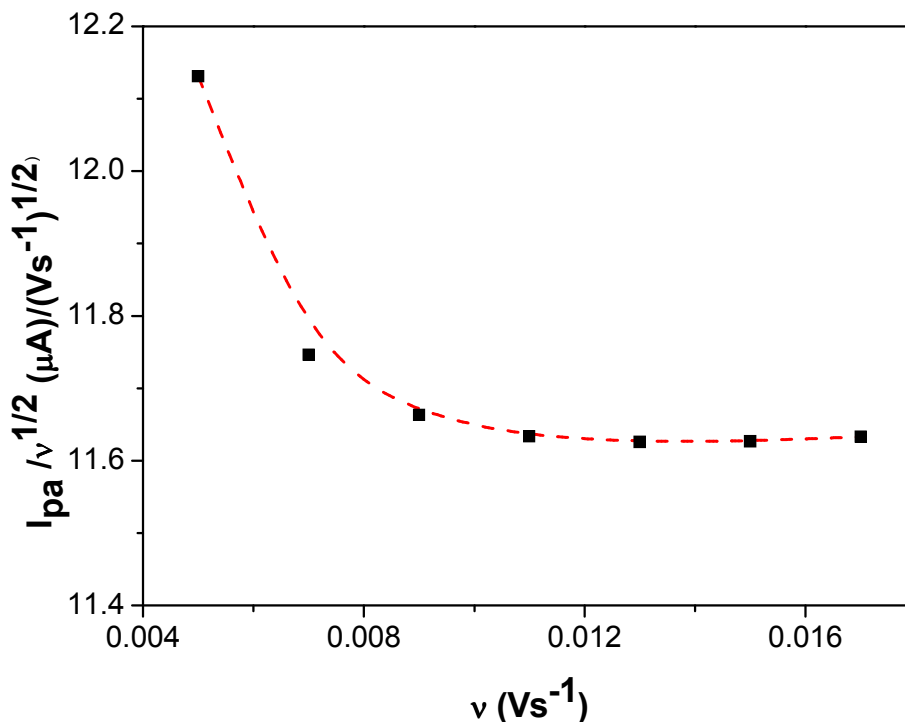
Figura 29 - Variação da corrente de pico anódica  $I_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  no ECV/MWCNT/poli-AF, em solução contendo  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v$ : 0,005-0,011  $\text{V s}^{-1}$ .



Fonte: Autor, 2011.

Assim, esta dependência linear com  $v^{1/2}$  sugere que o processo seja controlado por difusão, na faixa de velocidade de varredura de potencial estudada. Para ratificar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre o NADH e o ECV/MWCNT/poli-AF de fato apresenta uma etapa química acoplada, foram realizados alguns ensaios neste sentido, o qual através do gráfico da corrente de pico normalizada com a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $I_{pa}/v^{1/2}$ ) versus  $v$  (Figura 30) é possível observar um perfil característico de um típico processo eletroquímico-químico catalítico ( $EC_{cat}$ ) (BARD e FAULKNER, 2001).

Figura 30 - Variação da corrente de pico anódica normalizada  $I_{pa}/v^{1/2}$  vs.  $v$  no ECV/MWCNT/poli-AF em solução contendo  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v$ :  $0,005\text{-}0,017 \text{ V s}^{-1}$ .

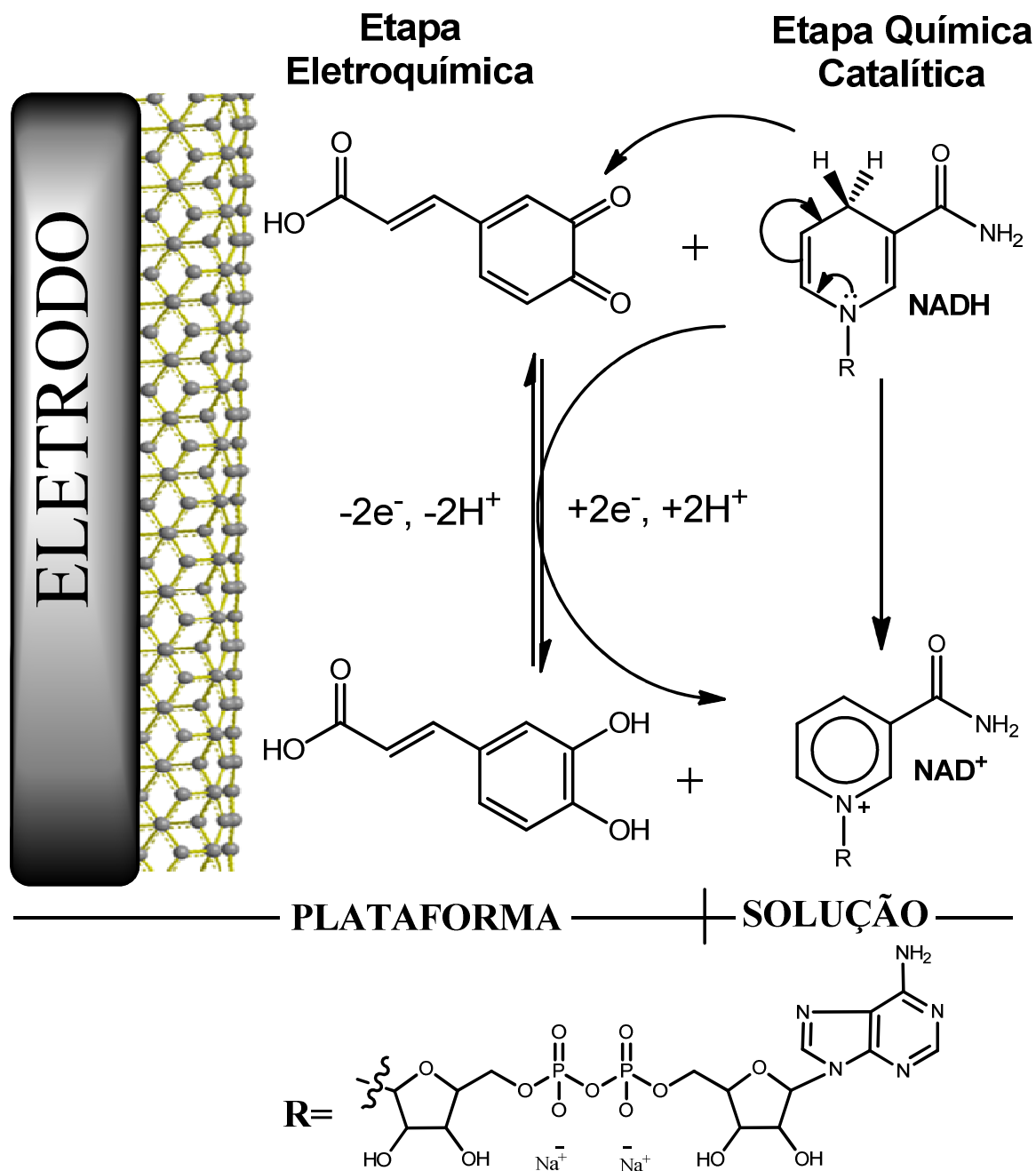


Fonte: Autor, 2011.

Os substituintes hidroxila e metoxila no ácido ferúlico podem ser oxidados, formando a respectiva quinona que, na varredura reversa, pode ser reduzida novamente ao grupo hidroquinona por um processo de dois elétrons e dois prótons. Assim, o ciclo catalítico para a oxidação electrocatalítica de NADH envolve o par redox (quinona/hidroquinona), semelhante ao sistema bem conhecido e reportado na literatura (SILVA *et al.*, 2010), como pode ser sugerido pela Figura 31.

Em geral, o grupo eletrogerado - quinona, é hábil para se submeter a um processo de transferência de elétron-próton-elétron sequencial ou a uma transferência de hidreto (CARLSON e MILLER, 1985).

Figura 31 - Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de eletrocatalise do NADH sobre a plataforma ECV/MWCNT/poli-AF.

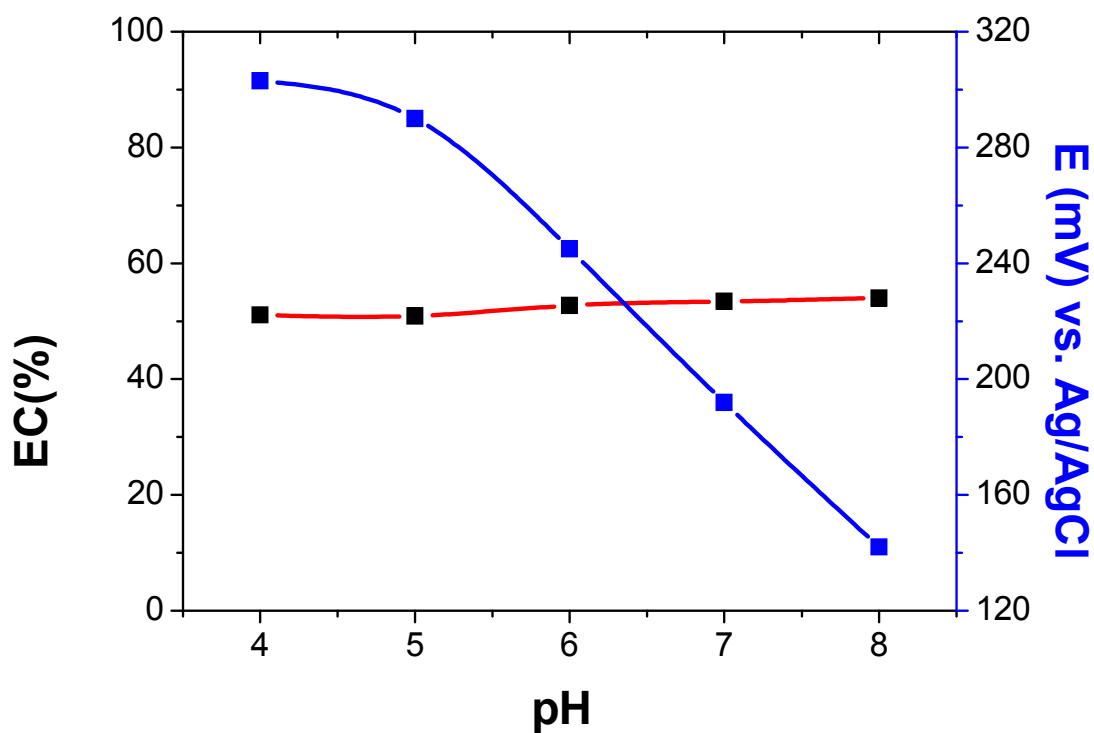


Fonte: Autor, 2011.

Além da otimização dos parâmetros para a polimerização, foram também otimizados os parâmetros de catálise, entre estes o pH, (Figura 32) que não se mostrou muito influente no sinal de catálise, já o potencial aplicado, como era de se

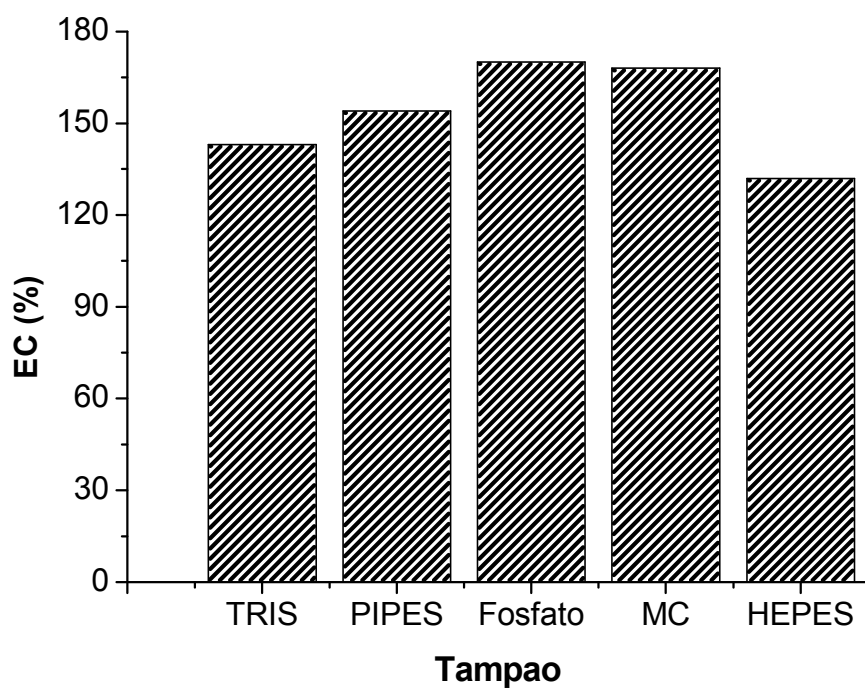
esperar, teve uma grande variação, com a maior EC observada em 302 mV. Já o meio tamponante a ser utilizado, não se mostrou importante, figura 33.

Figura 32 – Eficiência catalítica em função do pH e/ou potencial aplicado.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 33 – Variação da eficiência catalítica em função do meio tamponante.



Fonte: Autor, 2011.

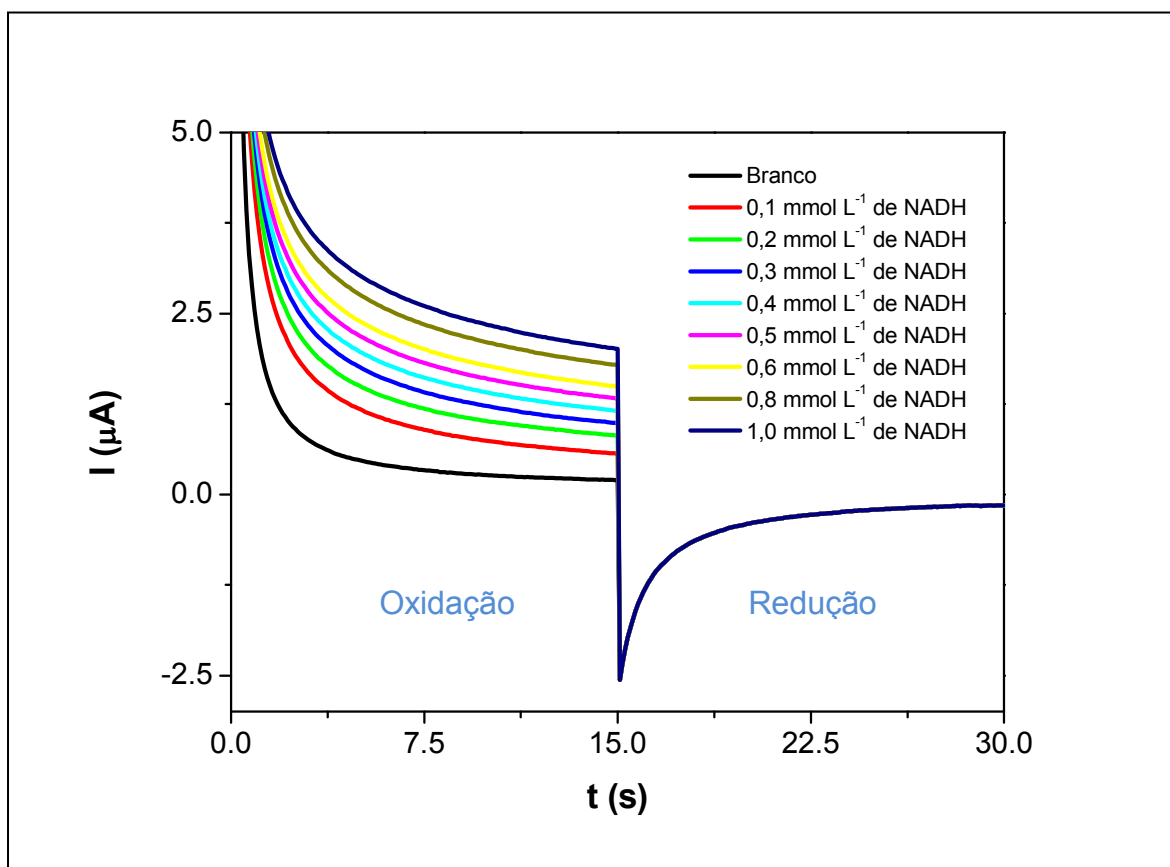
#### 5.4 Estudos Cronoamperométricos

Para a avaliação quantitativa do comportamento eletrocatalítico da oxidação de NADH frente ao ECV/MWCNT/*poli*-AF, no intuito de obter alguns parâmetros cinéticos foi empregada a cronoamperometria de duplo salto de potencial. A Figura 34 mostra as curvas de corrente *versus* tempo, obtidos com ECV/MWCNT/*poli*-AF,  $E_{\text{inicial}} = +0,200 \text{ V}$  e  $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$  *versus* Ag/AgCl para várias concentrações de NADH, em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 7,0. Como pode ser verificado, não há corrente catódica líquida correspondente à redução do mediador, na presença de NADH.

Neste contexto, experimentos foram realizados com o objetivo de estudar o mecanismo da reação, bem como avaliar as constantes de velocidade do referido processo eletrocatalítico. A escolha do pH 7 foi também racionalizada, uma vez que há uma grande quantidade de enzimas desidrogenases que dependem do processo redox do NADH e que são dependentes do pH, apresentando um pH ótimo em 7 (LIMA *et al.*, 2008a; LIMA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010). Além disso, é também neste pH, onde ambos NADH e  $\text{NAD}^+$  mostram maiores estabilidades, quando dissolvidos em solução aquosa (CHENAULT e WHITESIDES, 1987) e onde a maioria dos valores prévios de  $\kappa_{\text{cat}}$  foram reportados na literatura (GORTON e DOMÍNGUEZ, 2002).

Assim sendo, os cronoamperogramas de duplo salto de potencial direto e reverso para o mediador na ausência de NADH, mostraram-se simétricos com um consumo de carga igual para redução e oxidação do sistema redox eletrogerado na superfície do ECV/MWCNT/*poli*-AF. Por outro lado, na presença de diferentes concentrações de NADH, os valores da corrente anódica associada aos amperogramas diretos são significativamente maiores do que aqueles observados para o processo reverso (Figura 34).

Figura 34 - Cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/poli-AF em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7, na ausência e presença de NADH,  $E_{\text{inicial}} = +0,200 \text{ V}$  e  $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl, respectivamente.

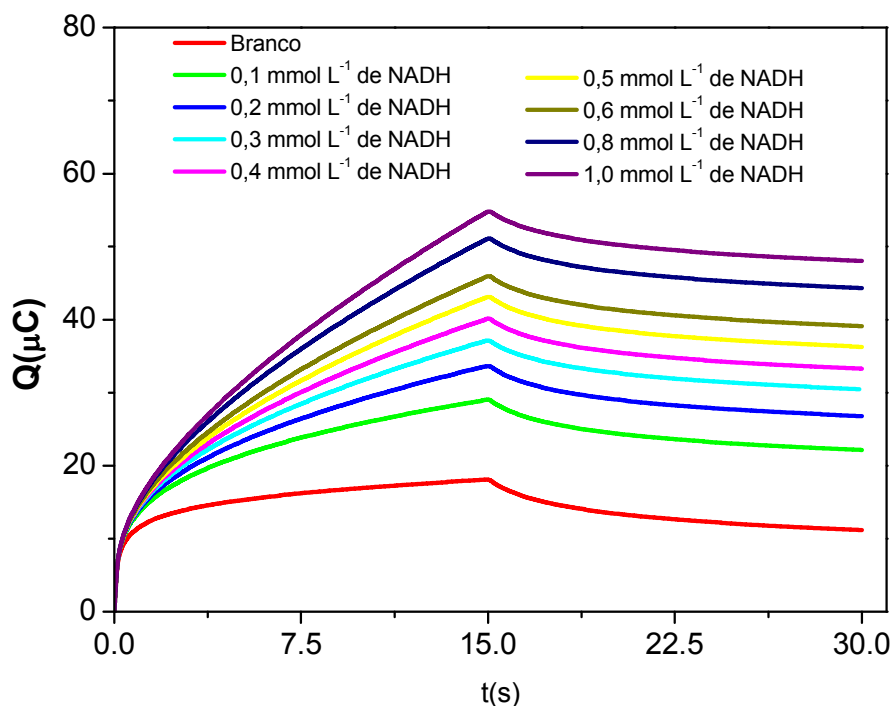


Fonte: Autor, 2011.

A partir da integração dos cronoamperogramas, é possível visualizar melhor a carga, tanto do processo catódico, quanto do anódico. Nestes, há um aumento significativo da carga do referido processo anódico e uma diminuição no processo catódico (Figura 35), indicando, portanto, que o grupo quinona está sendo consumido pela etapa química acoplada como observado na Figura 35.



Figura 35 - Integração dos cronoamperogramas obtidos ECV/MWCNT/poli-AF, em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,  $E_{\text{inicial}} = +0,200 \text{ V}$  e  $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl, respectivamente.



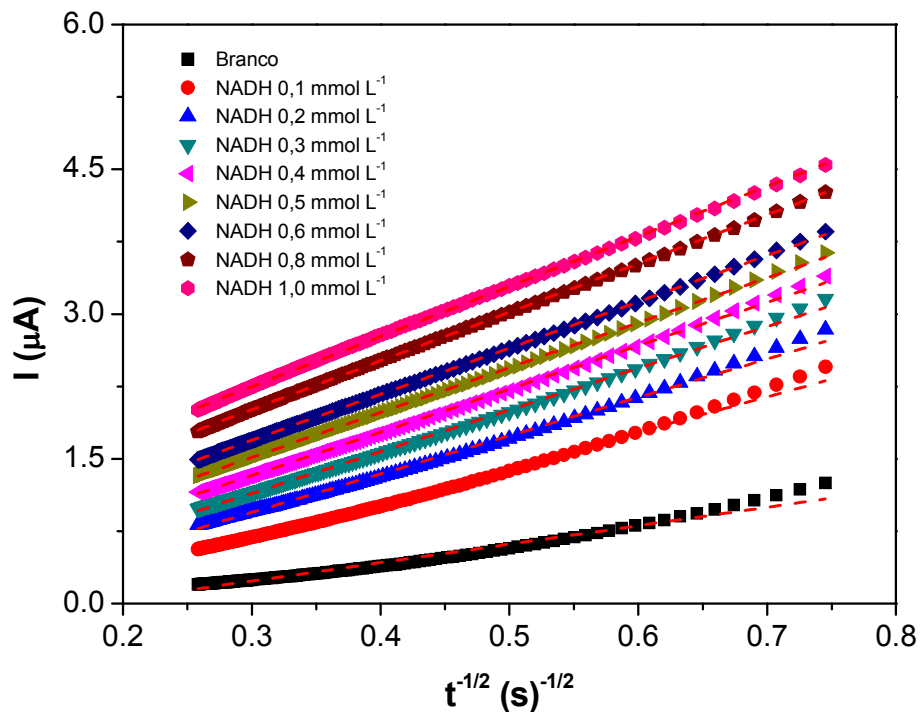
Fonte: Autor, 2011.

Também foi possível usar a cronoamperometria para estimar o coeficiente de difusão do NADH em solução. Para um material eletroativo com coeficiente de difusão,  $D_{\text{NADH}}$ , a corrente correspondente à reação química (sob controle difusional) é descrita pela Equação de Cottrell, Equação 5 (BARD e FAULKNER, 2001):

$$I = nFAD_{\text{NADH}}^{1/2}C_0\pi^{-1/2}t^{-1/2} \quad (\text{Equação. 5})$$

Sendo  $D_{\text{NADH}}$  e  $C_0$  o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) e a concentração de NADH no seio da solução ( $\text{mol L}^{-1}$ ), respectivamente. A Figura 36 mostra os gráficos de  $I$  versus  $t^{1/2}$  com o melhor ajuste linear para diferentes concentrações de NADH, o qual indica que a corrente observada deve ser controlada pela difusão de NADH em solução.

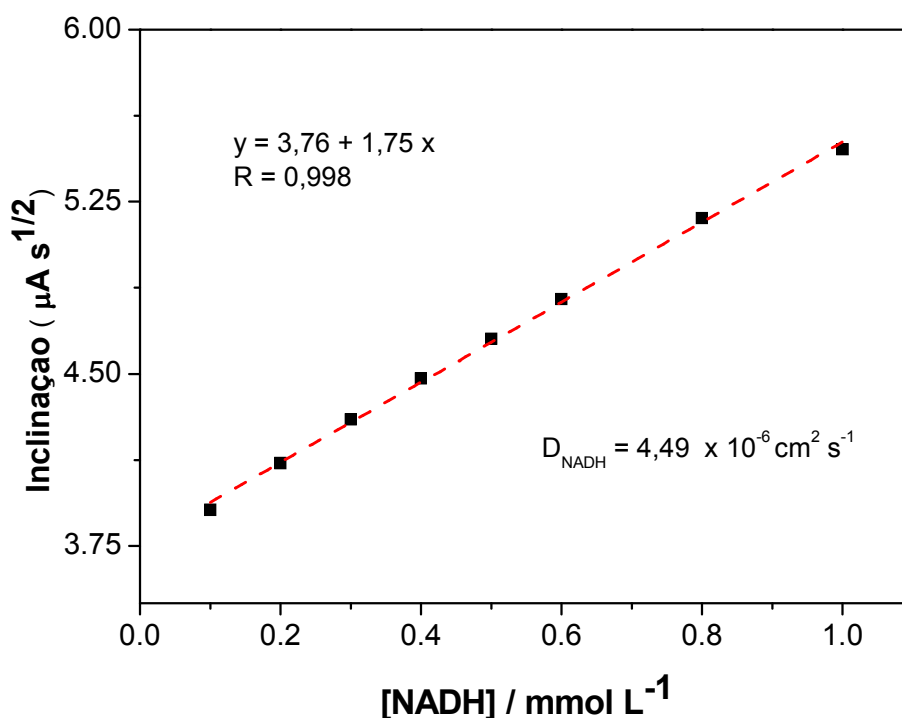
Figura 36 - Gráfico de  $I$  vs.  $t^{-1/2}$  obtidos a partir dos cronoamperogramas da Figura 42 em ECV/MWCNT/poli-AF em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7 na ausência e presença de NADH,  $E_{\text{inicial}} = +0,200 \text{ V}$  e  $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl, respectivamente.



Fonte: Autor, 2011.

Um gráfico a partir das inclinações obtidas das linhas retas *versus* a concentração de NADH foi construído (Figura 37). A partir da inclinação da Figura 37 e usando a Equação de Cottrell (Equação 4), um coeficiente de difusão de  $4,49 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  foi obtido para a faixa de concentração de NADH estudada. Este valor está próximo aos valores reportados na literatura (SANTHIAGO *et al.*, 2009; LIMA, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

Figura 37 - Gráfico de inclinação ( $I/t^{1/2}$ ) versus a concentração de NADH obtidos a partir da Figura 36 do ECV/MWCNT/poli-AF, em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7, na ausência e presença de NADH,  $E_{\text{inicial}} = +0,200 \text{ V}$  e  $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ , respectivamente



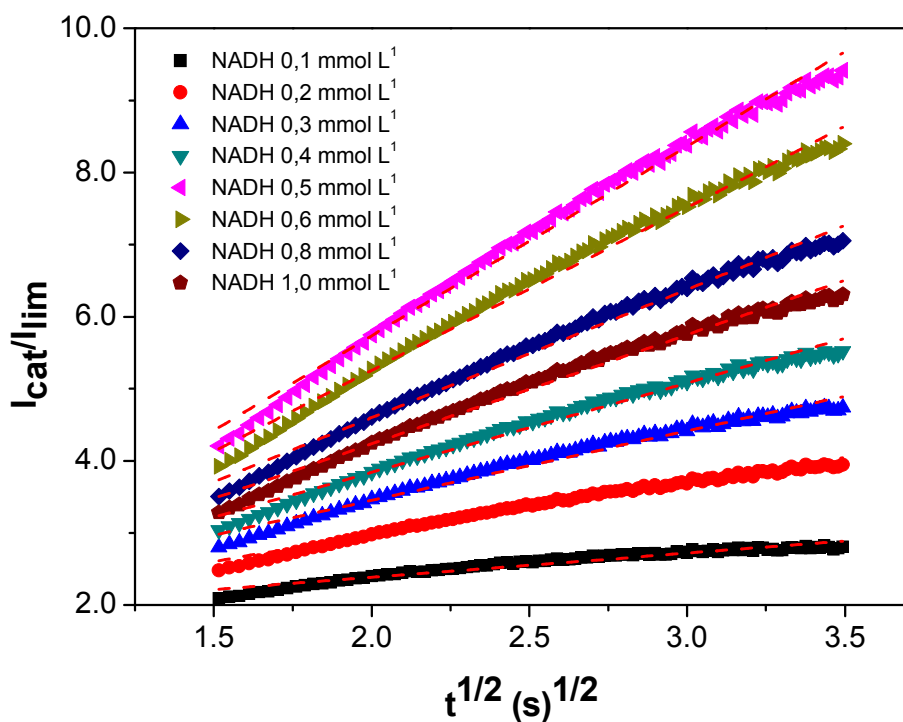
Fonte: Autor, 2011.

Além disso, a constante de velocidade,  $k_{\text{cat}}$ , para a reação química entre o NADH e os sítios redox confinados na superfície do eletrodo modificado pode ser avaliada. Este cálculo foi possível através da cronoamperometria com base no método descrito na literatura (GALUS, 1976; LIMA *et al.*, 2008, SANTHIAGO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

$$I_{\text{cat}}/I_{\text{Lim}} = \pi^{1/2}(kC_s t)^{1/2} \text{ (Equação .6)}$$

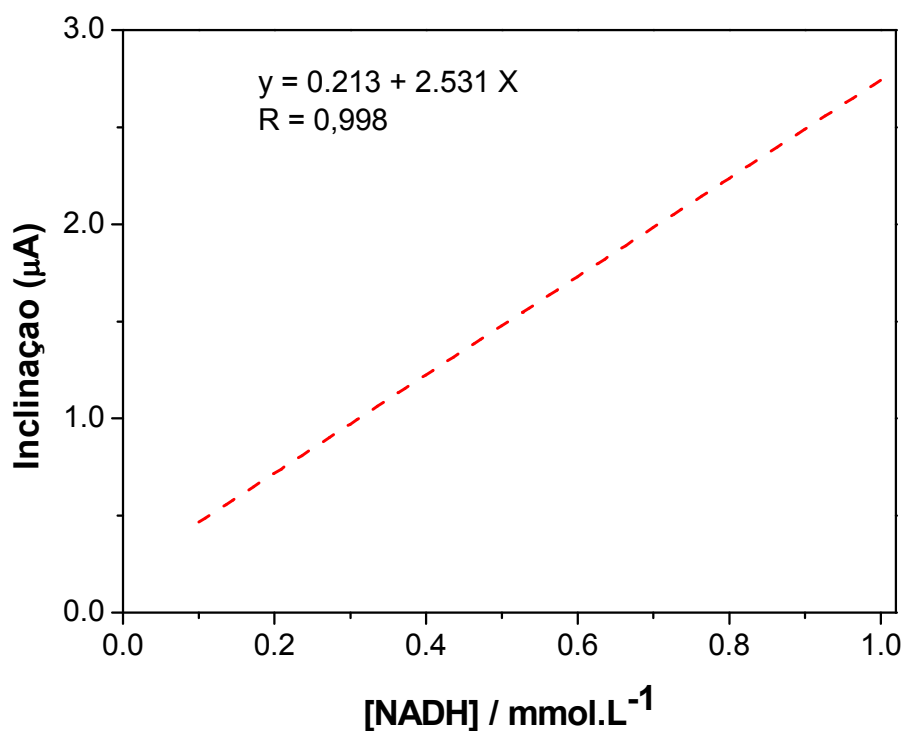
A partir das inclinações do gráfico  $I_{\text{cat}}/I_{\text{Lim}}$  versus  $t^{1/2}$  (Figura 38), foi possível obter o gráfico da Figura 39 (inclinações vs. [NADH]). Assim, usando o novo coeficiente angular da Figura 39 e a Equação 6, determinou-se de forma simples, o valor de  $k_{\text{cat}}$ , o qual apresentou um valor calculado para  $k_{\text{cat}}$  na faixa de concentração estudada de  $5,57 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Figura 38 - Dependência de  $I_{cat}/I_{lim}$  vs.  $t^{1/2}$  derivado dos cronoamperogramas da Figura 34 em ECV/MWCNT/poli-AF, em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7, na ausência e presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,200 \text{ V}$  e  $E_{final} = -0,100 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl, respectivamente.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 39 - Gráfico da inclinação de  $I_{cat}/I_{lim}$  vs. concentração de NADH em ECV/MWCNT/poli-AF, em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7 na ausência e presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,100 \text{ V}$  e  $E_{final} = -0,200 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl, respectivamente.

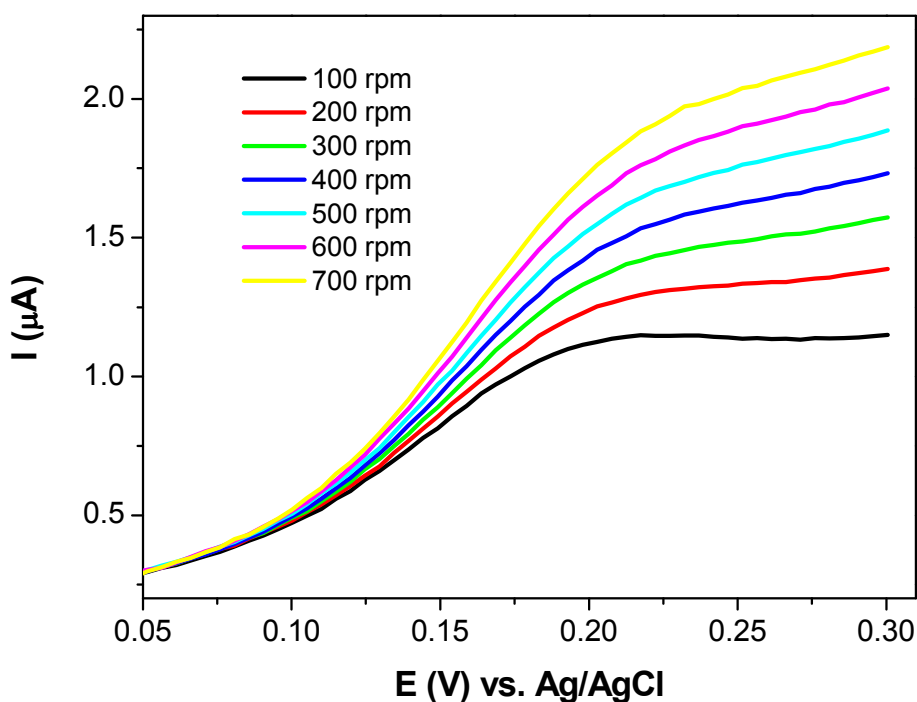


Fonte: Autor, 2011.

## 5.5 Estudos com Eletrodo de Disco Rotatório

Para uma melhor avaliação quantitativa do comportamento eletrocatalítico da oxidação de NADH frente a ECV/MWCNT/*poli*-AF, medidas cinéticas foram realizadas em diferentes concentrações de NADH, a diversas velocidades de rotação  $\omega$  ( $\text{rad s}^{-1}$ ). Estes experimentos foram realizados em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) e uma velocidade de varredura fixa de  $5 \text{ mV s}^{-1}$  (Figura 40).

Figura 40 - Curvas de polarização obtidas para oxidação eletrocatalítica de NADH,  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ : no GCE/MWCNT/*poli*-AF,  $v = 5,0 \text{ mVs}^{-1}$ .



Fonte: Autor, 2011.

O processo catalítico é resultado da difusão do NADH para a superfície eletródica, onde ocorre a redução do mediador oxidado para formar  $\text{NAD}^+$  e a forma reduzida do mediador.

Neste contexto, experimentos foram realizados com o objetivo de estudar o mecanismo da reação, bem como avaliar as constantes de velocidade do referido processo eletrocatalítico. A escolha do pH 7 foi também racionalizada, uma vez que há uma grande quantidade de enzimas desidrogenases que dependem do processo redox de NADH e que são dependentes do pH, apresentando uma atividade ótima em pH 7 (BARTLETT *et al.*, 1997). Além disso, é também neste pH onde ambos NADH e NAD<sup>+</sup> mostram maiores estabilidades quando dissolvidos em solução aquosa (CHENAULT e WHITESIDES, 1987) e onde a maioria dos valores prévios de  $\kappa_{cat}$  foram reportados na literatura para o pH 7 (GORTON e DOMÍNGUEZ, 2002).

Para muitos eletrodos quimicamente modificados usados para oxidação eletrocatalítica de NADH, têm sido postulado que um complexo de transferência de carga é formado na reação entre NADH e o mediador, por causa do valor de  $\kappa_{cat}$  diminuir com o aumento na concentração de NADH (SANTOS *et al.*, 2002). Além disso, acredita-se que um complexo de transferência de carga, inicialmente formado entre os reagentes, comporta-se analogamente à cinética de Michaelis-Menten, para reações enzimáticas (GORTON e DOMÍNGUEZ, 2002).

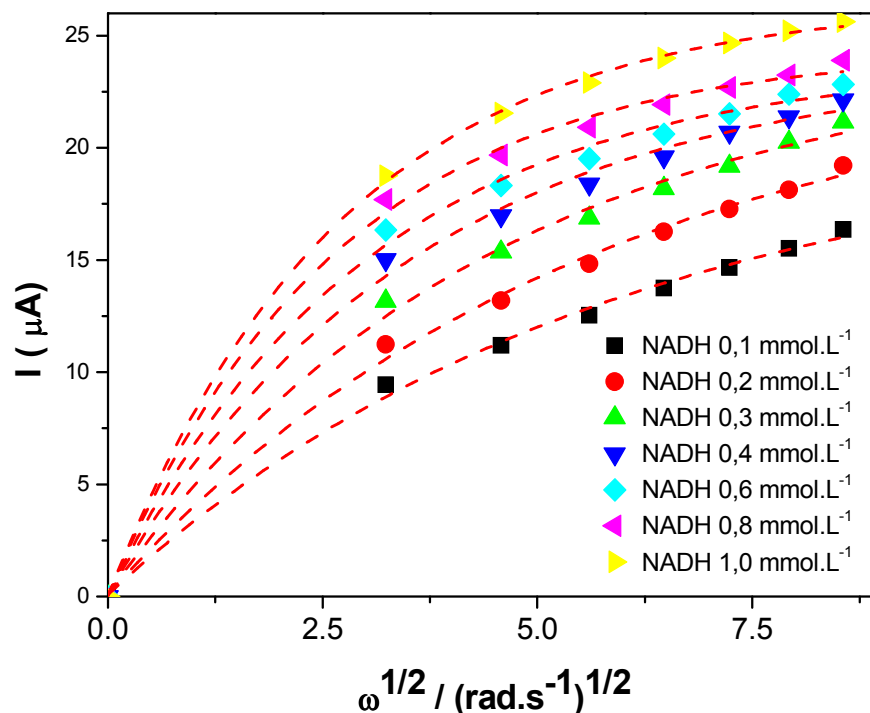
A Figura 41 mostra os gráficos de Levich obtidos para o ECV/MWCNT/poli-AF para sete diferentes concentrações de NADH, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,80 e 1,00 mmol L<sup>-1</sup>, tampão fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0). A corrente de oxidação para o NADH, no eletrodo modificado pode ser limitada pelo transporte de massa do NADH para a superfície do eletrodo e/ou pela cinética da reação. A partir da Figura 40, fica evidente que há limitação cinética na reação global. Para o eletrodo de disco rotatório, a corrente limitada pelo transporte de massa ( $I_{d(L)}$ ) depende da velocidade de rotação,  $\omega$ , e da concentração de NADH no seio da solução [NADH], de acordo com a equação de Levich (BARD e FAULKNER, 2001) (Equação 7):

$$I_{d(L)} = 0,620nFA[NADH]D^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2} \text{ (Equação 7)}$$

Sendo  $n$  o número de elétrons,  $F$  a constante de Faraday,  $\nu$  a viscosidade cinemática, e  $D$  o coeficiente de difusão. Os valores de  $D$  e  $\nu$  de  $4,49 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$

(MOIROUX e ELVING, 1980) e  $0,01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (BARD e FAULKNER, 2001), respectivamente foram empregados.

Figura 41 - Gráfico de Levich para a resposta electrocatalítica de estado-estacionário para um EDR de ECV/MWCNT/poli-AF, em diferentes [NADH]. Estudos realizados em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e  $\Gamma = 3.35 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .



Fonte: Autor, 2011.

Para uma reação catalisada, a corrente limitada cineticamente ( $I_{kin}$ ) é dada geralmente pela seguinte expressão (Equação 8):

$$I_{kin} = nFAk_{cat}\Gamma[NADH]D^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2} \quad (\text{Equação 8})$$

Sendo  $\Gamma$  a cobertura total do *poli-AF*, uma dependência linear da corrente catalítica na  $\omega^{1/2}$  é esperada a partir da equação de Levich (Equação 6). O desvio observado a partir da equação de Levich pode ser o resultado da etapa limitada

quimicamente. Assim, a expressão geral para a corrente global,  $I$ , é dada por (Equação 9):

$$I^{-1} = I_{d(L)}^{-1} + I_{kin}^{-1} \text{ (Equação 9)}$$

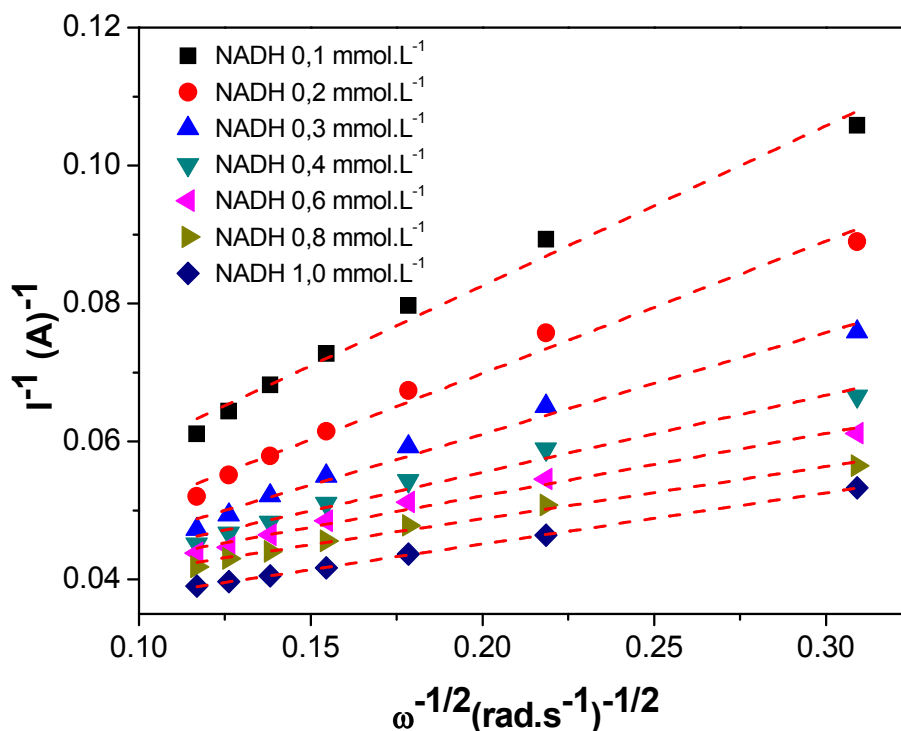
Fazendo a inversão das equações 6 e 7, tem-se a conhecida Equação 9 de Koutecky-Levich, muito utilizada em reações catalíticas empregando eletrodos contendo mediadores para transferência de elétrons (MURRAY, 1984,). Esta equação foi empregada na obtenção da Figura 42, variando a concentração de [NADH] (Equação 10):

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{nFA\kappa_{cat}\Gamma[NADH]} + \frac{1}{0,620nFA\nu^{-1/6}D^{2/3}[NADH]\omega^{1/2}} \text{ (Equação 10)}$$

Pela inclinação da curva, é possível obter o número de elétrons ( $n$ ) envolvidos na reação. Através da interceptação do gráfico de Koutecky-Levich é possível também avaliar o  $\kappa_{cat}$ , conhecendo-se então o valor de  $\Gamma$ .



Figura 42 - Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados na Figura 40. Estudos realizados em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e  $\Gamma = 3,35 \times 10^{-10}$  mol cm<sup>-2</sup>.



Fonte: Autor, 2011.

O valor da constante  $k_{\text{cat}}$  (constante da reação catalítica) apresentou-se altamente dependente da  $[\text{NADH}]$  como observado na Figura 43a. Este comportamento tem sido observado para outros eletrodos modificados com mediadores usados na oxidação eletrocatalítica de NADH (SANTOS *et al.*, 2002; KUBOTA e GORTON, 1999), sendo esta alta dependência explicada pela formação de um complexo de transferência de carga (CT-complexo) entre o NADH e o mediador, antes da formação do produto da reação.

Este tipo de mecanismo de reação é bastante empregado para o estudo de cinética de Michaelis-Menten e obtenção da constante que leva o mesmo nome ( $K_M$ ), que pode ser definida conforme a Equação 11 (GORTON, 1986):

$$K_M = \frac{k_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} \text{ (Equação 11)}$$

A constante de velocidade reação catalítica,  $\kappa_{cat}$ , para qualquer concentração de NADH pode ser expressa como proposto abaixo (GORTON, 1986):

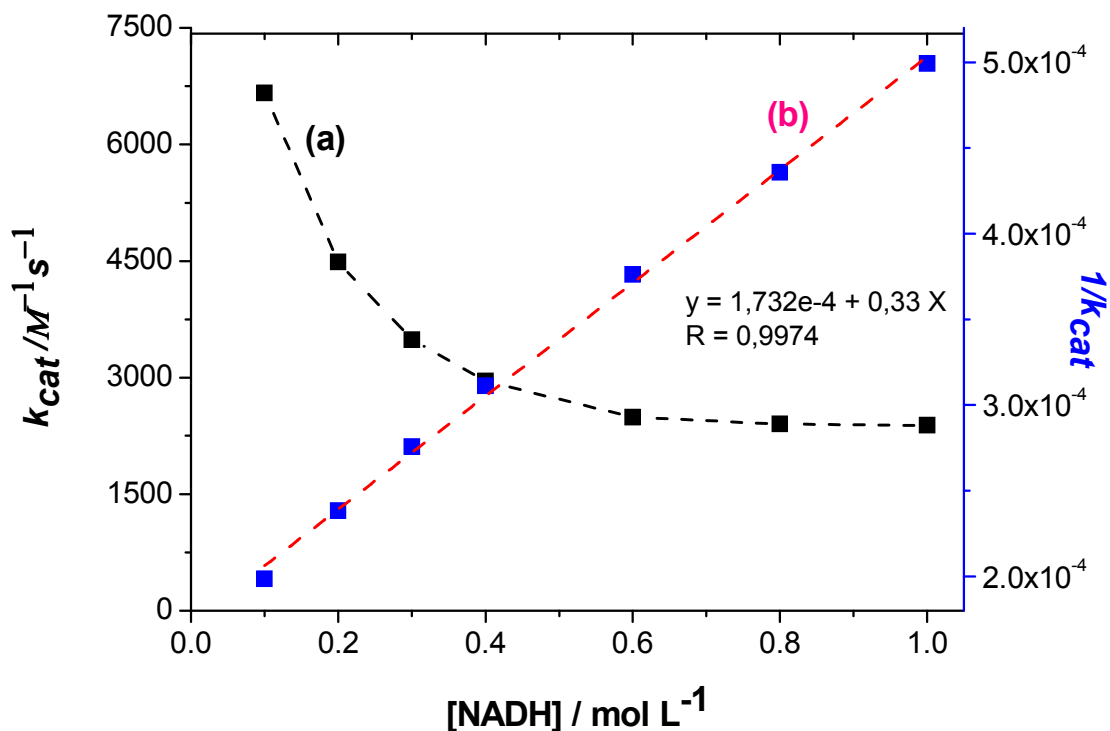
$$k_{cat} = \frac{K_{+2}}{K_M + [NADH]} \text{ (Equação 12)}$$

Invertendo a Equação 12, obtém-se a expressão

$$\frac{1}{k_{cat}} = \frac{K_M}{k_{+2}} + \frac{[NADH]}{k_{+2}} \text{ (Equação 13)}$$

A construção do gráfico  $1/\kappa_{obs}$  vs.  $[NADH]$  como observado na Figura 43(b) fornece uma relação linear, compatível com a equação  $\kappa_{cat}^{-1} = 0,33[NADH] + 1,732 \times 10^{-4}$ , com coeficiente de correlação de 0,9974 para  $n = 7$ , sendo o  $\kappa_{cat}^{-1}$  em  $\text{mol L}^{-1} \text{ s}$  e  $[NADH]$  em  $\text{mmol L}^{-1}$ , sendo indicativo que um complexo de transferência de carga deve se formar entre o poli-AF e o NADH. Do coeficiente angular da curva, é possível calcular o valor de  $\kappa_{+2}$  e, do coeficiente linear, o valor de  $K_M$  pode ser avaliado. Como verificado na Tabela 2, o  $\kappa_{cat}$ ,  $\kappa_{+2}$  e  $K_M$  foram calculados e apresentaram os valores de  $5,77 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ ,  $3,03 \text{ s}^{-1}$  e  $3,35 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Figura 43 - (a) Variação de  $k_{cat}$  vs. [NADH] obtidos para o ECV/MWCNT/poli-AF e (b) Variação de  $1/k_{cat}$  vs. [NADH]. Estudos realizados em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e  $\Gamma = 3,35 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2} \text{ mol cm}^{-2}$ .



Fonte: Autor, 2011.

A Tabela 2 lista alguns trabalhos registrados na literatura envolvendo eletrodos modificados com vários mediadores, bem como seus respectivos parâmetros cinéticos referentes ao processo de oxidação eletrocatalítica de NADH, permitindo, portando, comparar os resultados apresentados com o presente sensor desenvolvido e discutido ao longo deste tópico.

Tabela 2-Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados para eletro-oxidação de NADH.

Ref.	$E^0$ (mV)	Ph	$\Gamma$ (mol cm <sup>-2</sup> )	$k_{cat}$ (mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mol L <sup>-1</sup> )
(PEREIRA <i>et al.</i> , 2003)	-140 vs. SCE	7,0	5,7x10 <sup>-9</sup>	5,5x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>-4</sup>
(NASSEF <i>et al.</i> , 2006)	+200 vs. Ag/AgCl	7,0	4,2x10 <sup>-10</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>-5</sup>
(SANTOS <i>et al.</i> , 2002)	-230 vs. SCE	7,0	5,2x10 <sup>-9</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	2,1x10 <sup>-4</sup>
(KUBOTA e GORTON, 1999)	-220 vs. SCE	7,0	6,8x10 <sup>-10</sup>	8,2x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>-3</sup>
(SANTOS <i>et al.</i> , 2002)	-60 vs. SCE	7,0	4,4x10 <sup>-9</sup>	1,8x10 <sup>3</sup>	2,7x10 <sup>-4</sup>
(MUNTEANU <i>et al.</i> , 2003)	+156 vs. Ag/AgCl	6,0	2,7x10 <sup>-10</sup>	3,0x10 <sup>3</sup>	3,1x10 <sup>-4</sup>
(ANTIOCHIA <i>et al.</i> , 2005)	—	7,0	9,7x10 <sup>-11</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	—
(VASANTHA e CHEN, 2006)	+200 vs. Ag/AgCl	7,0	2,6x10 <sup>-10</sup>	9,8x10 <sup>3</sup>	—
(LIMA <i>et al.</i> , 2009)	+100 vs. Ag/AgCl	7,0	6,5x10 <sup>-10</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>	2,7x10 <sup>-5</sup>
<b>Este Trabalho</b>	<b>+200 vs. Ag/AgCl</b>	<b>7,0</b>	<b>3,35 x 10<sup>-10</sup></b>	<b>5,77 x 10<sup>3</sup></b>	<b>3,35 x 10<sup>-7</sup></b>

Assim, de acordo com a Tabela 2, observa-se que o valor de  $\kappa_{cat}$  é maior quando comparado aos valores publicados previamente para os sistemas eletrodo-mediador, exceto para os trabalhos de NASSEF e colaboradores (2006). Por outro lado, mediadores que têm apresentado altos valores de  $\kappa_{cat}$ , têm também requerido altos sobrepotenciais para a oxidação eletrocatalítica de NADH, como verificado no trabalho desenvolvido por NASSEF e colaboradores (2006), dificultando, assim, sua aplicação no desenvolvimento de biossensores.

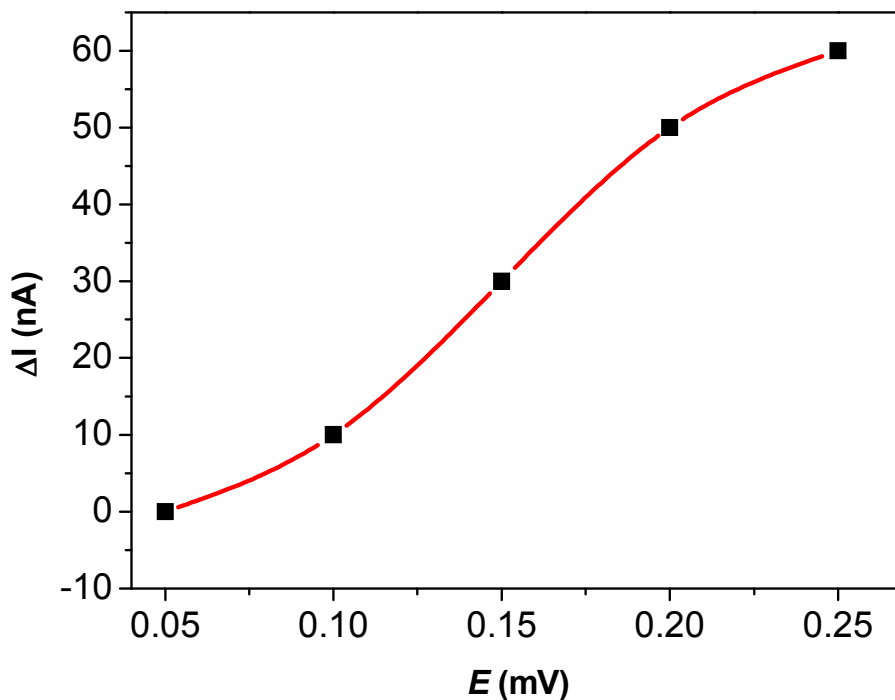
## 5.6 Detecção amperométrica de NADH

Para obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de NADH foram realizados em diferentes concentrações, em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0).

Nas medidas amperométricas, um estudo inicial foi realizado com intuito de determinar o melhor potencial para aplicar no eletrodo para a oxidação de NADH. Assim, o potencial aplicado foi escolhido, baseado nas medidas das intensidades da corrente catalítica provenientes da etapa química acoplada. Assim, foram selecionados alguns potenciais a partir dos voltamogramas obtidos, os quais variaram de 0,05 até 0,25 V vs. Ag/AgCl com um variação de potencial de 30 mV para cada análise.

Na Figura 44, observa-se um discreto aumento da corrente do processo de oxidação de NADH para os potenciais entre 0,05 e 0,25 V vs. Ag/AgCl, com um máximo em +0,200V vs. Ag/AgCl. Para potenciais de oxidação maiores, a corrente tende a aumentar de forma menos acentuada. Portanto, o potencial aplicado de +0,20 V vs. Ag/AgCl foi selecionado para a oxidação de NADH. Além disso, em potenciais maiores há uma perda de seletividade no tocante a futuras aplicações destas plataformas nonaestruturadas como novos dispositivos nanoestruturados, tais como biossensores NADH dependentes.

Figura 44 - Corrente em função do potencial aplicado para o ECV/MWCNT/poli-AF em presença de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH. Condições utilizadas, tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

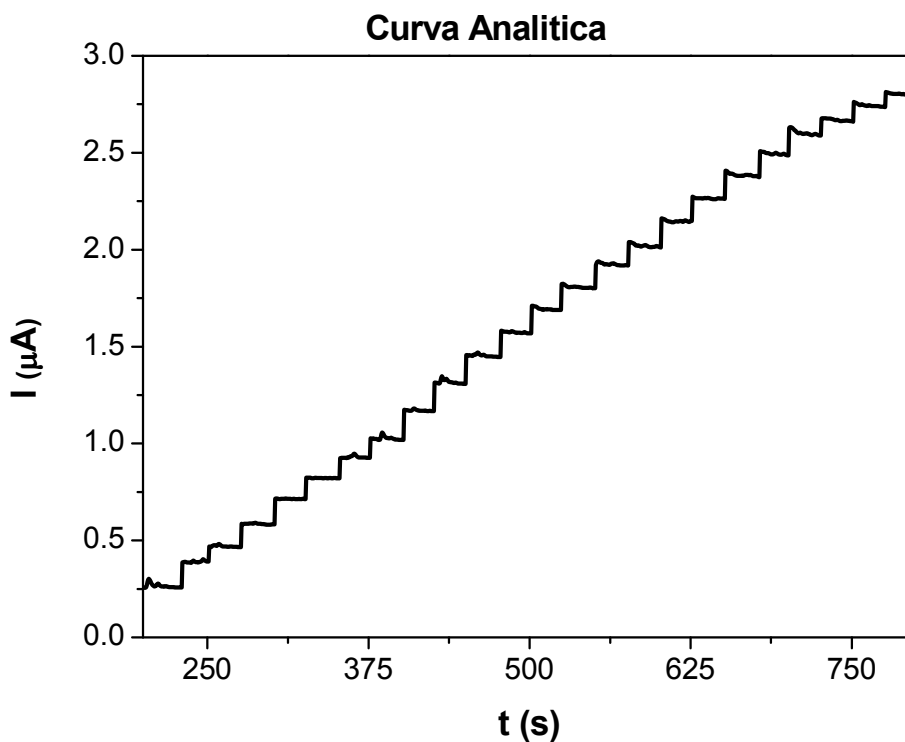


Fonte: Autor, 2011.

Para obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de NADH foram realizados em diferentes concentrações em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) e potencial aplicado de  $+0,200 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  (Figura 47). Assim, o sensor amperométrico proposto mostrou uma faixa linear de resposta de  $1,0$  a  $20,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com um coeficiente de correlação de  $0,997$  para  $n = 20$  (Figura 46), que pode ser expressa de acordo com Equação 14

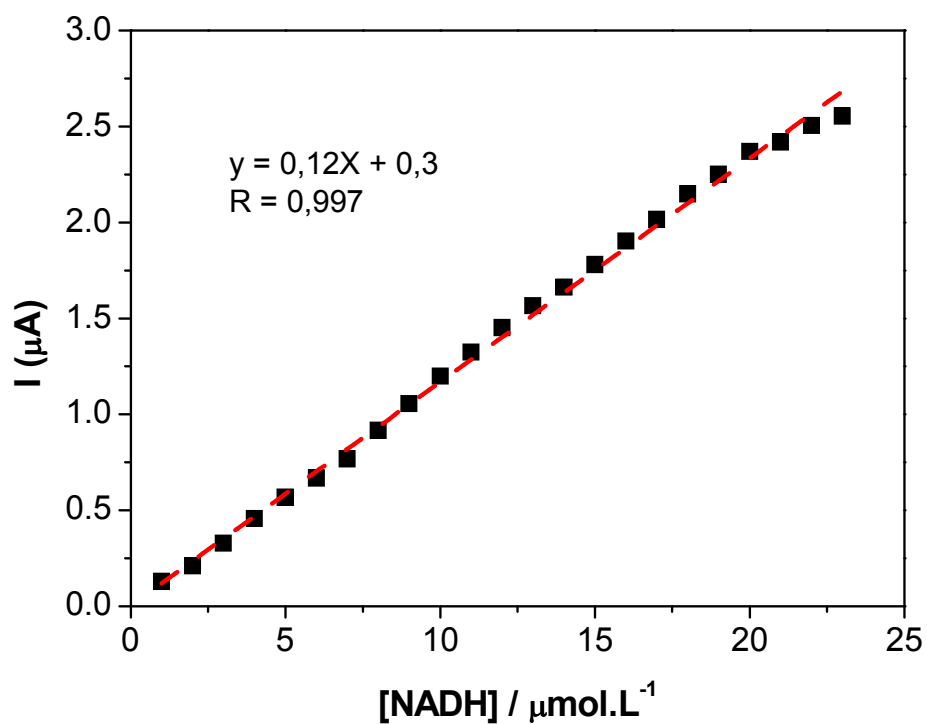
$$\Delta I / \mu\text{A} = 0,29 (\pm 0,01) + 0,12 (\pm 0,01) [\text{NADH}] / \mu\text{mol L}^{-1} \text{ (Equação 14)}$$

Figura 45 - Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/poli-AF obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 46 - Curva analítica para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/poli-AF, em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0  $E_{\text{aplicado}} = +0,2$  V vs. Ag/AgCl.



Fonte: Autor, 2011.

Assim, esta sensibilidade de  $0,29\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$  pode ser atribuída à eficiência na transferência de elétrons ( $\text{H}^+$ ) entre a quinona e o NADH. Um limite de detecção de  $92,7 \text{ nmol L}^{-1}$  foi determinado usando uma razão  $3 \sigma/b$  e limite de quantificação de  $0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$ , usando  $10 \sigma/b$ , sendo  $\sigma$  o desvio padrão do valor médio para dez amperogramas do branco e  $b$  o coeficiente angular da curva analítica, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987).

A resposta para este sensor foi rápida, alcançando um máximo em 0,2 s como pode ser observado na Figura 45. Este tempo de resposta é muito curto, considerando que o eletrodo utilizado é feito a base de nanotubos de carbono, onde a difusão das espécies deve ser mais dificultada. Sabe-se que uma condição para o sensor responder é que haja difusão da solução através da plataforma, sendo que esta etapa influi no tempo de resposta. Provavelmente, o procedimento usado para construir o sensor fundamentado em MWCNT e *poli-AF* gerado *in situ* resultou num sistema bem empacotado, tornando difícil a solução difundir profundamente através da plataforma, e isso pode levar a uma resposta mais rápida, pois somente os sítios superficiais devem contribuir para a resposta.

A Tabela 1 (página 39) lista alguns trabalhos reportados na literatura, envolvendo eletrodos quimicamente modificados com vários mediadores, para a detecção de NADH, isto para fins de comparação com os dados obtidos neste trabalho. O sensor construído a base de ácido ferúlico e nanotubos de carbono apresentou valores semelhantes ou melhores do que alguns trabalhos reportados, obtendo assim um potencial de oxidação para NADH menos positivo, uma boa sensibilidade, e um limite de detecção baixo. Além disso, o sensor é construído de forma simples e a matéria prima é disponível comercialmente e de baixo custo.



## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho relata a construção de uma nova plataforma nanoestruturada simples, fundamentada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com ácido ferúlico e ativada *in situ*. Este processo de ativação promove a formação do par redox (quinona /hidroquinona), sendo uma alternativa viável para a determinação eletrocatalítica de NADH.

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do NADH por meio da voltametria de disco rotatório empregando o sistema desenvolvido ECV/MWCNT/*poli*-AF comprovaram a eficiência deste sistema em mediar a transferência de elétrons, envolvendo a molécula de NADH.

A plataforma nanoestruturada modificada pelo mediador *poli*-AF constitui um excelente sistema para a elaboração de sensores capazes de promover a detecção de NADH, com ótima sensibilidade e estabilidade, bem como um tempo de resposta baixo.

A partir dos sensores desenvolvidos, foi possível operar a célula eletroquímica durante a eletrooxidação do NADH, aplicando potencial de +0,200 V vs. Ag/AgCl para o sensor desenvolvido, o que amplia bastante a possibilidade de uso destes sensores em amostras complexas, pois, neste potencial, o sensor torna-se mais seletivo e muito menos sensível a possíveis interferentes.

A avaliação dos parâmetros analíticos deste sensor mostrou que são ótimos dispositivos para a determinação de NADH. Além disso, o sensor desenvolvido apresenta-se como uma alternativa para o desenvolvimento de biossensores com o emprego de enzimas NADH dependentes, uma vez que o mediador possui grupos carboxílicos disponíveis para a formação de ligações covalentes com estas enzimas.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. N., Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, p.1576, 1958.
- AHAMMAD, A.J.S; LEE, J.J; RAHMAN, M.A. Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. **sensors**, p.9 (4), p. 2289-2319, 2009.
- ALKIRE C. R.ICHARD , DIETER M. KOLB, JACEK LIPKOWSKI, AND PHILIP N. Ross. Aet al. **Advances in Electrochemica Science and Engineering Chemically Modified Electrodes** WILEY-VCH Volume 1, 2009.
- ANKE KRUEGER, **Carbon Materials and Nanotechnology** edited by Timothy D. Burchell, 2010).
- ANTOLINI, E.: Composite materials An emerging class of fuel cell catalyst supports, **applied catalysis b-environmental**, v. 100 (3-4), p.413-426, 2010.
- ARAÚJO C.ELSO L.: de junho 2009 “Desenvolvimento de sensor amperométrico baseados em eletrodo carbono grafite para a determinação de ácido cítrico em bebidas”. Uberlândia: UFU, 2009. pg 18, (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação do instituto de Química, Faculdade de Química, Universidade Federal de Uberlandia, Uberlândia, 2009.
- BACHTOLD, A. *et al.* , FUHRER, M. S., PLYASUNOV, S., FORERO, M., ANDERSON, E. ZETTL, H., A., MCEUEN, P. L., Scanned Probe Microscopy of Electronic Transport in Carbon Nanotubes. **Physical Review Letters**, v. 84, p.6082, 2000.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. **Electrochemical methods – Fundamental and Applications**, 2nd, ed. Wiley, New York, 2001.
- BARROS, E. B., JORIO, A., SAMSONIDZE, G. G., CAPAZ, R. B., SOUZA FILHO, A. G., MENDES FILHO, J., DRESSELHAUS, G., DRESSELHAUS, M. S., *et al.* **Review on the symmetry-related properties of carbon nanotubes. Physics Reports**, v. 431, p.261-302, 2006..

BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. .Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. *Eclética Química*, 30, 4, 51-58, 2005.

BARTLETT, P., Modified electrode surface in amperometric biosensors. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 28, p.B10-B17, 1990.

BELIN., T.; EPRON, F., Characterization methods of carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering B**, v. 119, p.105-118, 2005.

BORGES, H. K., Utilização de esponja de lã de aço comercial como catalisador para a síntese de nanotubos de carbono, **Dissertação de Mestrado**, GQM-UFPR, 2007.

CALVERT, P., Nanotube composites: A recipe for strength. **Nature**, v. 399, p.210-211, 1999.

CAMPBELL, J. K.; SUN, L., CROOKS, R. M., Electrochemistry Using Single Carbon Nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p.3779-3780, 1999.

CARLSON, B.W.; MILLER, L. L.. Mechanism of the oxidation of NADH by quinones. Energetics of one-electron and hydride routes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 479-485, 1985.

CHENAULT, H.K.; WHITESIDES, G.M.. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in enzymatic synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 14, p. 147-197, 1987.

CHUJO, Y., Organic--inorganic hybrid materials. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 1, p.806-811, 1996.

DAVIS, J. J., COLES, R. J., ALLEN, H., HILL, O., *et al.* Protein electrochemistry at carbon nanotube electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 440, p.279-282, 1997.

- DEKANSKI, A., STEVANOVIC, J., STEVANOVIC, R., NIKOLIC, B. Z., JOVANOVIĆ, V. M. *et. al.*, Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. **Carbon**, v. 39, p.1195-1205, 2001.
- DICKS, A. L, The role of carbon in fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 156, p.128-141, 2006.
- DIVYA, P., SAVITRI, D., MITRA, C., Covalent enzyme immobilization onto glassy carbon matrix-implications in biosensor design. **Journal of Biosciences**, v. 23, p.131-136, 1998.
- DRESSELHAUS, M. S., DRESSELHAUS, G., EKLUND, P. C., Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes, **Academic Press**, San Diego, 1995.
- DRESSELHAUS, M. S., FUTURE DIRECTIONS IN CARBON SCIENCE. **Annual Review of Materials Science**, v. 27, p.1-34, 1997.
- EVSTEFEEVA, Y. E., PLESKOV, Y. V., KUTSAY, A. M., BELLO, I., *et al.* Electrode Properties of Tetrahedral Amorphous Carbon. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 41, p.772-777, 2005.
- FABREGAS E AND B PRIETO-SIMON, **Biosensors Bioelectronics**, v. 19, p. 1131, 2004.
- FÀBREGAS E.; B. PRIETO-SIMÓN, Comparative study of electron mediators used in the electrochemical oxidation of NADH, **Biosensors and Bioelectronics** v. 19, p. 1131–1138, 2004.
- FARRÉ MARINELLAM., LINA KANTIANI, SANDRA PÉREZ, DAMIÀ BARCELÓ *et al.* Sensors and biosensors in suport of EU Directives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, No. 2, 2009.
- FRACKOWIAK, E., BÉGUIN, F., Carbon materials for the electrochemical storage of energy in capacitors. **Carbon**, v. 39, p.937-950, 2001.
- GALUS, Z. **Fundamentals of Electrochemical Analysis**, Ellis Horwood Press, New York, 313, 1976.

- GEHR, R. J.; BOYD, R. W., Optical Properties of Nanostructured Optical Materials. **Chemistry of Materials**, v. 8, p.1807-1819, 1996
- GORTON, L.; DOMÍNGUEZ., E. Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator –modified electrodes. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 82, 4, p. 371-392, 2002.
- GUO, T. N., P.; RINZLER, A.G.; TOMANEK, D.; COLBERT, D.T.; SMALLEY, R.E., Self assembly of tubular fullerenes. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, p.10694-10697, 1995.
- IJIMA, S., Helical microtubules of graphitic carbon.**Nature**, v. 354, p.56-58, 1991
- MOIROUX J. MOIROUX; and P. ELVING, J. ELVING, **Analitical Chemistry.**, 1978, 50, 1056.
- KANG, Y.-J.;, KIM, Y. -H.;, CHANG, K. J., Electrical transport properties of nanoscale devices based on carbon nanotubes. **Current Applied Physics**, v. 9, p.S7-S11, 2009.
- KATAKIS I.; E. DOMINGUEZ, Catalytic electrooxidation of NADH for dehydrogenaseamperometric biosensors, **Microchimica Acta** v. 126 (1997p.) 11–32 1997.
- KROTO H. W.;, J. R. Helth, S. C. O'Brien, R. F. Curl & R. E. Smalley, **Nature** v.318, 1945
- KUMAR, SA; CHEN, SM. Electroanalysis of NADH using conducting and redox active polymer/carbon nanotubes modified electrodes - A review. **SENSOR**, v. 8 (2), p. 739-766, 2008.
- LANE R. F.; A. T. HUBBARD, J. Phys. Chem. **1973**, 77, 1401-1410
- LAVIRON E., **Jornal. Electroanal. Chemistry**. v.19, p. 101, 1979.
- LEHNINGER , A. L. & NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de bioquímica. São Paulo: Savier, p. 123, 2008.

LIMA, P. R. .Tese. Eletrodo Modificado à Base de 4-Nitroftalonitrila: Sensor Amperométrico para Quantificação de Alguns Antioxidantes de Relevância Biológica. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

LIMA, P.R.; *et al.*,. Electrocatalytic activity of 4-nitroththalonitrile-modified electrode for the l-glutathione detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 758-764, 2008b.

LIU, Y. ., XIAOLONG, S., TINGKAI, Z., JIEWU, Z., HIRSCHER, M., PHILIPP, F. *et al.*, Amorphous carbon nanotubes produced by a temperature controlled DC arc discharge. **Carbon**, v. 42, p.1852-1855, 2004.

LUBIN, G., Handbook of Composites. Nova York: Ed. Van Nostrand Reinhold, 1982.

M. PETEK e STANLEY BRUCKENSTEIN, **Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**. v. 42 p. 397-401, 1973. )

MICHAEL M. COX, DAVID L. NELSON, Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth edition (W.H. Freeman & Co), 2005

MOIROUX J.; P.J. ELVING., Effect of adsorption, electrode material, operational variables on the oxidation dihydronicotinamide adenine dinucleotide at carbon electrodes, **Analytical Chemistry** v. 50 (1978) p. 1056–1062, 1978.

MOUSTY, C., Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes-new trends. **Applied Clay Science**, v. 27, p.159-177, 2004.

MURRAY R. W.; in Electroanalytical Chemistry (Eds.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1984**, pp. 191-368, vol.13.

NATAN J. *et al.*, Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates. **Science**, v.267 p-1639-1632, 1995.

NOSSOL, EDSONE.: Novos eletrodos construídos a partir de diferentes nanoestruturas de carbono. Curitiba, 2009. P. 17. Tese (Mestrado) – Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 1983.

OLSON, C., ADAMS, R. N., Carbon paste electrodes application to anodic voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 22, p.582-589, 1960.

OLSON, C., ADAMS, R. N., Carbon paste electrodes application to cathodic reductions and anodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 29, p.358-363, 1963.

PAN, X., FAN, Z., CHEN, W., DING, Y., LUO, H., BAO, X *et al.*, Enhanced ethanol production inside carbon-nanotube reactors containing catalytic particles. **Nature Materials**, v. 6, p.507-511, 2007.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T., Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, p.1012-1021, 2002.

PETER J F HARRIS.; **Carbon Nanotube Science**, Synthesis, Properties and Applications, University of Reading, UK, 1Ed. 2009.

PIERSON HUGH O., **HANDBOOK OF CARBON, GRAPHITE, DIAMOND AND FULLERENES**: Properties, Processing and Applications, USA: Noyes Publications, pPg 264, 1993.

RAO, A. M. ., RICHTER, E., BANDOW, S., CHASE, B., EKLUND, P. C., WILLIAMS, K. A., FANG, S., SUBBASWAMY, K. R., MENON, M., THESS, A., SMALLEY, R. E., DRESSELHAUS, G., DRESSELHAUS, M. *Set al.*, Diameter-Selective Raman Scattering from Vibrational Modes in Carbon Nanotubes. **Science**, v. 275, p.187-191, 1997.

ROMERO, J. G. V.; LUENGO, C. A.; HUBER, J. G.; ROSOLEN, J. M., Síntese de nanotubos de carbono de parede simples por sublimação de grafite em atmosfera de hélio. **Química Nova**, v. 25, p.59-61, 2002.

ROZLOSNIK, N.: New directions in medical biosensors employing poly(3,4-ethylenedioxy thiophene) derivative-based electrodes. **analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395 (3), p. 637-645, 2009.

- RUSLING J. F.; in electroanalytical *Electroanalytical Chemistry* (Eds.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1994**, pp. 1-88, vol.18,1994.
- SAITO, R. D., G.; DRESSELHAUS, M. S., **Physical Properties of Carbon Nanotubes**, Imperial College Press, London, 1998.
- SANTHIAGO, M., *et al.* In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached to nanostructured platform for NADH electrooxidation. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 6609-6616, 2009.
- SANTOS, R. M., LOURENÇO. *et al.*, A comparative study of carbon fiber-based microelectrodes for the measurement of nitric oxide in brain tissue. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p.704-709, 2008.
- SILVA, F. A. S. *et al.* Poly-xanthurenic acid as an efficient mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochemistry Communications**, v. 12, p. 450-454, 2010.
- SOUZA FILHO, A. G. D., FAGAN, S. B., Funcionalização de nanotubos de Carbono. **Química Nova**, v. 30, p.1695-1703, 2007.
- SOUZA, M. D. F. B., Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p.191-195, 1997.
- ŠVANCARA, I., SCHACHL, K., Testing of unmodified carbon paste electrodes. **Chemiké Listy**, v. 93, p.490-499, 1999.
- THÉVENOT, D.R. *et al.*. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121-131, 2001.
- TOKUDA, K., MORITA, K., SHIMIZU, Y., Cyclic voltammetry at microhole array electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 61, p.1763-1768, 1989.
- VARMA, S., MITRA, C. K., Bioelectrochemical studies on catalase modified glassy carbon paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 4, p.151-157, 2002.



WALLACE, G.G E KANE-MAGUIRE, LAP. Manipulating and monitoring biomolecular interactions with conducting electroactive polymers. **advanced materials**, v. 14 (13-14), p. 953+, 2002.

WANG, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. **electroanalysis**, v. 17 (1), p. 7-14, 2005.

WANG, J., ANIK KIRGÖZ, Ü., MO, J.-W., LU, J., NASSER KAWDE, A., MUCK, A.*et. al.*, Glassy carbon paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 3, p.203-208, 2001.

WANG, Q.; DONG, D.; LI, N.. Electrochemical response of dopamine at a penicillamine self-assembled gold electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 54, p. 169-175, 2001.

WATKINS B. F.; J. R. BEHLING, E. KARIVE, et al., J. Am. Chem. Soc. **1975**, v. 97, p. 3549-3550, 1975.

YAO, Z., KANE, C. L., DEKKER, C., High-Field Electrical Transport in Single-Wall Carbon Nanotubes. **Physical Review Letters**, v. 84, p.2941, 2000.

YOGESWARAN, U.; CHEN, S-M. Separation and concentration effect of f-MWCNTs on electrocatalytic responses of ascorbic acid, dopamine and uric acid at f-MWCNTs incorporated with poly (neutral red) composite films. **Electrochimica Acta**, v.52, p.5985–5996, 2007.

ZOULIS, N. E., EFSTATHIOU, C. E., Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids. **Analytica Chimica Acta**, v. 320, p.255-261, 1996.

ABREU, F. C., et. al. A importância de parâmetros eletroquímicos em químicamedicinal.. In: Montanari. (Org.). Química Medicinal. Métodos e Fundamentos emplanejamento de fármacos. são Paulo: EDUSP, 2010, v. 1, p. 186-229.

ABRIL. Nanotecnologia ajuda energia solar. Disponível em: <<http://tec.nologia.com/2009/10/14/honda-a-punto-de-fabricar-en-serie-materiales-basados-en-nanotubos-de-carbono/>>. Acesso em: janeiro de 2011

ADAMS, R. N., Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, p.1576, 1958.

AHAMMAD, A.J.S; LEE, J.J; RAHMAN, M.A. Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. **sensors**, p.9 (4), p. 2289-2319, 2009.

ALKIRE C. R.ICHARD , DIETER M. KOLB, JACEK LIPKOWSKI, AND PHILIP N. Ross. Aet al. Advances in Electrochemica **Science and Engineering Chemically Modified Electrodes** WILEY-VCH. v. 1, 2009.

ALKIRE, C. R, Advances in Electrochemical Science and Engineering **Chemically Modified Electrodes** v. 11 p. 17 2009

ALKIRE, C. R. et al. Advances in Electrochemica **Science and Engineering Chemically Modified Electrodes** WILEY-VCH Volume 1, 2009.

ALKIRE, KOLBE, LIPKOWSKI, ROSS, Advances in Electrochemical Science and Engineering **Chemically Modified Electrodes** Volume 11 pg 17 2009

ANKE KRUEGER, **Carbon Materials and Nanotechnology** edited by Timothy D. Burchell (2010) 2.

ANKE, K., **Carbon Materials and Nanotechnology** edited by Timothy D. Burchell (2010) 2.

ANTOLINI, E.: Composite materials An emerging class of fuel cell catalyst supports, **applied catalysis b-environmental**, v. 100 (3-4), p.413-426, 2010.

ANTOLINI, E.: Composite materials An emerging class of fuel cell catalyst supports, **applied catalysis b-environmental**, v. 100 (3-4), p.413-426, 2010.

ARAÚJO C.ELSO L.: de junho 2009 “Desenvolvimento de sensor amperométrico baseados em eletrodo carbono grafite para a determinação de ácido cítrico em bebidas”. Uberlândia: UFU, 2009. pg 18, (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação do instituto de Química, Faculdade de Química, Universidade Federal de Uberlandia, Uberlândia, 2009.

ARAÚJO C.ELSO L.: de junho 2009 “Desenvolvimento de sensor amperométrico baseados em eletrodo carbono grafite para a determinação de ácido cítrico em bebidas”. Uberlândia: UFU, 2009. P. 18, (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação do instituto de Química, Faculdade de Química, Universidade Federal de Uberlandia, Uberlândia, 2009.

BACHTOLD, A. *et al.* , FUHRER, M. S., PLYASUNOV, S., FORERO, M., ANDERSON, E. ZETTL, H., A., MCEUEN, P. L., Scanned Probe Microscopy of Electronic Transport in Carbon Nanotubes. **Physical Review Letters**, v. 84, p.6082, 2000.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. **Electrochemical methods – Fundamental and Applications**, 2nd, ed. Wiley, New York, 2001.

BARROS, E. B., JORIO, A., SAMSONIDZE, G. G., CAPAZ, R. B., SOUZA FILHO, A. G., MENDES FILHO, J., DRESSELHAUS, G., DRESSELHAUS, M. S., *et al.* **Review on the symmetry-related properties of carbon nanotubes. Physics Reports**, v. 431, p.261-302, 2006.

BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. .Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. *Eclética Química*, 30, 4, 51-58, 2005.

BARTLETT, P., Modified electrode surface in amperometric biosensors. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 28, p.B10-B17, 1990.

Battery Rechearch.Disponivel em:

<<http://aazmin.blogspot.com/2009/10/potentiostatgalvanostat-autolab-pgstat.html>>. Acesso em janeiro de 2011

BELIN., T.; EPRON, F., Characterization methods of carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering B**, v. 119, p.105-118, 2005.

BORGES, H. K., Utilização de esponja de lã de aço comercial como catalisador para a síntese de nanotubos de carbono, **Dissertação de Mestrado**, GQM-UFPR, 2007.

CALVERT, P., Nanotube composites: A recipe for strength. **Nature**, v. 399, p.210-211, 1999.

CAMPBELL, J. K.; SUN, L.; CROOKS, R. M., Electrochemistry Using Single Carbon Nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p.3779-3780, 1999.

CARLSON, B.W.; MILLER, L. L.. Mechanism of the oxidation of NADH by quinones. Energetics of one-electron and hydride routes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 479-485, 1985.

CHENAULT, H.K.; WHITESIDES, G.M.. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in enzymatic synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 14, p. 147-197, 1987.

CHUJO, Y., Organic--inorganic hybrid materials. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 1, p.806-811, 1996.

DAVIS, J. J., COLES, R. J., ALLEN, H., HILL, O., *et al.* Protein electrochemistry at carbon nanotube electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 440, p.279-282, 1997.

DEKANSKI, A., STEVANOVIC, J., STEVANOVIC, R., NIKOLIC, B. Z., JOVANOVIC, V. M. *et. al.*, Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. **Carbon**, v. 39, p.1195-1205, 2001.

DICKS, A. L, The role of carbon in fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 156, p.128-141, 2006.

DIVYA, P.; SAVITRI, D., MITRA, C., Covalent enzyme immobilization onto glassy carbon matrix-implications in biosensor design. **Journal of Biosciences**, v. 23, p.131-136, 1998.

- DRESSELHAUS, M. S., FUTURE DIRECTIONS IN CARBON SCIENCE. **Annual Review of Materials Science**, v. 27, p.1-34, 1997.
- DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; EKLUND, P. C., Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes, **Academic Press**, San Diego, 1995.
- EVSTEFEEVA, Y. E., PLESKOV, Y. V., KUTSAY, A. M., BELLO, I., *et al.* Electrode Properties of Tetrahedral Amorphous Carbon. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 41, p.772-777, 2005.
- FABREGAS E AND B PRIETO-SIMON, **Biosensors Bioelectronics**, v. 19, p.1131, 2004.
- FÀBREGAS E.; B. PRIETO-SIMÓN, Comparative study of electron mediators used in the electrochemical oxidation of NADH, **Biosensors and Bioelectronics** v. 19, p. 1131–1138, 2004.
- FARRÉ MARINELLAM., LINA KANTIANI, SANDRA PÉREZ, DAMIÀ BARCELÓ *et al.* Sensors and biosensors in suport of EU Directives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, No. 2, 2009.
- FRACKOWIAK, E.; BÉGUIN, F., Carbon materials for the electrochemical storage of energy in capacitors. **Carbon**, v. 39, p.937-950, 2001.
- GALUS, Z..**Fundamentals of Electrochemical Analysis**, Ellis Horwood Press, New York, 313, 1976.
- GEHR, R. J.; BOYD, R. W., Optical Properties of Nanostructured Optical Materials. **Chemistry of Materials**, v. 8, p.1807-1819, 1996
- GORTON, L.; DOMÍNGUEZ., E. Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator –modified electrodes. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 82, 4, p. 371-392, 2002.
- GUO, T. N., P.; RINZLER, A.G.; TOMANEK, D.; COLBERT, D.T.; SMALLEY, R.E., Self assembly of tubular fullerenes. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, p.10694-10697, 1995.

IJIMA, S., Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p.56-58, 1991

KANG, Y.-J.;, KIM, Y. -H.;, CHANG, K. J., Electrical transport properties of nanoscale devices based on carbon nanotubes. **Current Applied Physics**, v. 9, p.S7-S11, 2009.

KATAKIS I.; E. DOMINGUEZ, Catalytic electrooxidation of NADH for dehydrogenaseamperometric biosensors, **Microchimica Acta** v. 126 (1997p.) 11–32 1997.

KROTO H. W.;, J. R. Helth, S. C. O'Brien, R. F. Curl & R. E. Smalley, **Nature** v.318, 1945

KUMAR, SA; CHEN, SM. Electroanalysis of NADH using conducting and redox active polymer/carbon nanotubes modified electrodes - A review. **SENSOR**, v. 8 (2), p. 739-766, 2008.

LANE R. F.; A. T. HUBBARD, J. Phys. Chem. **1973**, 77, 1401-1410

LAVIRON E., **Jornal. Electroanal. Chemistry**. 101 (1979) 19.

LEHNINGER , A. L. & NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de bioquímica. São Paulo: Savier, 2008. pg. 123.

LIMA, P. R. .Tese. Eletrodo Modificado à Base de 4-Nitroftalonitrila: Sensor Amperométrico para Quantificação de Alguns Antioxidantes de Relevância Biológica. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

LIMA, P.R.; *et al.*,. Electrocatalyticactivityof 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the l-glutathionedetection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, pg. 758-764, 2008b.

LIMA, P.R.; *et al.*,. Electrocatalyticactivityof 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the l-glutathionedetection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, pg. 758-764, 2008b.

LIU, Y. ., XIAOLONG, S., TINGKAI, Z., JIEWU, Z., HIRSCHER, M., PHILIPP, Fet al., Amorphous carbon nanotubes produced by a temperature controlled DC arc discharge. **Carbon**, v. 42, p.1852-1855, 2004.

LUBIN, G., Handbook of Composites. Nova York: Ed. Van Nostrand Reinhold, 1982.

M. PETEK e STANLEY BRUCKENSTEIN, **Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**. v. 42 p. 397-401, 1973.

MICHAEL M. COX, DAVID L. NELSON, Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth edition (W.H. Freeman & Co), 2005

MOIROUX J. MOIROUX; and P. ELVING, J. ELVING, **Analitical Chemistry**., 1978, 50, 1056.

MOIROUX J.; P.J. ELVING., Effect of adsorbtion, electrode material, operational variables on the oxidation dihydronicotinamide adenine dinucleotide at carbon electrodes, **Analytical Chemistry** v. 50 (1978) p. 1056–1062, 1978.

MOUSTY, C., Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes-new trends. **Applied Clay Science**, v. 27, p.159-177, 2004.

MURRAY R. W.; lin Electroanalytical Chemistry (Eds.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1984**, pp. 191-368, vol.13.

NATAN J. *et al*, Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates. **Science**,v.267 p-1639-1632, 1995.

NOSSOL, EDSONE.: Novos eletrodos construídos a partir de diferentes nanoestruturas de carbono. Curitiba, 2009. P. 17. Tese (Mestrado) – Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 1983.

OLSON, C., ADAMS, R. N., Carbon paste electrodes application to anodic voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 22, p.582-589, 1960.

OLSON, C., ADAMS, R. N., Carbon paste electrodes application to cathodic reductions and anodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 29, p.358-363, 1963.

PAN, X., FAN, Z., CHEN, W., DING, Y., LUO, H., BAO, X *et al.*, Enhanced ethanol production inside carbon-nanotube reactors containing catalytic particles. **Nature Materials**, v. 6, p.507-511, 2007.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T., Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, p.1012-1021, 2002.

PETER J F HARRIS.; **Carbon Nanotube Science**, Synthesis, Properties and Applications, University of Reading, UK, 1Ed. 2009.

PIERSON HUGH O., **HANDBOOK OF CARBON, GRAPHITE, DIAMOND AND FULLERENES**: Properties, Processing and Applications, USA: Noyes Publications, pPg 264, 1993.

RAO, A. M., *et al.*, Diameter-Selective Raman Scattering from Vibrational Modes in Carbon Nanotubes. **Science**, v. 275, p.187-191, 1997.

ROMERO, J. G. V.; LUENGO, C. A.; HUBER, J. G.; ROSOLEN, J. M., Síntese de nanotubos de carbono de parede simples por sublimação de grafite em atmosfera de hélio. **Química Nova**, v. 25, p.59-61, 2002.

ROZLOSNIK, N.: New directions in medical biosensors employing poly(3,4-ethylenedioxy thiophene) derivative-based electrodes. **analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395 (3), p. 637-645, 2009.

RUSLING J. F.; in electroanalytical Electroanalytical Chemistry (Eds.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1994**, pp. 1-88, vol.18,1994.

SAITO, R. D., G.; DRESSELHAUS, M. S., **Physical Properties of Carbon Nanotubes**, Imperial College Press, London, 1998.



SANTHIAGO, M., *et al.* In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached to nanostructured platform for NADH electrooxidation. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 6609-6616, 2009.

SANTOS, R. M., *et al.*, A comparative study of carbon fiber-based microelectrodes for the measurement of nitric oxide in brain tissue. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p.704-709, 2008.

SILVA, F. A. S. *et al.*. Poly-xanthurenic acid as an efficient mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochemistry Communications**, v. 12, p. 450-454, 2010.

SOUZA FILHO, A. G. D., FAGAN, S. B., Funcionalização de nanotubos de Carbono. **Química Nova**, v. 30, p.1695-1703, 2007.

SOUZA, M. D. F. B., Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p.191-195, 1997.

ŠVANCARA, I., SCHACHL, K., Testing of unmodified carbon paste electrodes. **Chemiké Listy**, v. 93, p.490-499, 1999.

THÉVENOT, D.R. *et al.*. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121-131, 2001.

TOKUDA, K., MORITA, K., SHIMIZU, Y., Cyclic voltammetry at microhole array electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 61, p.1763-1768, 1989.

VARMA, S., MITRA, C. K., Bioelectrochemical studies on catalase modified glassy carbon paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 4, p.151-157, 2002.

WALLACE, G.G E KANE-MAGUIRE, LAP. Manipulating and monitoring biomolecular interactions with conducting electroactive polymers. **advanced materials**, v. 14 (13-14), p. 953+, 2002.

WANG, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. **electroanalysis**, v. 17 (1), p. 7-14, 2005.

WANG, J., ANIK KIRGÖZ, Ü., MO, J.-W., LU, J., NASSER KAWDE, A., MUCK, A.*et. al.*, Glassy carbon paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 3, p.203-208, 2001.

WANG, Q.; DONG, D.; LI, N.. Electrochemical response of dopamine at a penicillamine self-assembled gold electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 54, p. 169-175, 2001.

WATKINS B. F.; J. R. BEHLING, E. KARIVE, et al., J. Am. Chem. Soc. **1975**, v. 97, p. 3549-3550, 1975.

YAO, Z., KANE, C. L., DEKKER, C., High-Field Electrical Transport in Single-Wall Carbon Nanotubes. **Physical Review Letters**, v. 84, p.2941, 2000.

YOGESWARAN, U.; CHEN, S-M. Separation and concentration effect of f-MWCNTs on electrocatalytic responses of ascorbic acid, dopamine and uric acid at f-MWCNTs incorporated with poly (neutral red) composite films. **Electrochimica Acta**, v.52, p.5985–5996, 2007.

ZOULIS, N. E., EFSTATHIOU, C. E., Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids. **Analytica Chimica Acta**, v. 320, p.255-261, 1996.